

Molekulare Mechanismen der Interferon- Resistenz humaner Zytomegalieviren



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Steffen Krauss aus Regensburg

2007

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Regensburg, November 2007

.....

Steffen Krauss

Promotionsgesuch eingereicht am: 19.11.07

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.08

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Michael Thomm

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Reinhard Wirth (1. Vorsitzender)

Prof. Dr. Michael Thomm (1. Prüfer, Erstgutachten)

Prof. Dr. Hans Wolf (2. Prüfer, Zweitgutachten)

Prof. Dr. Richard Warth (3. Prüfer)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Taxonomie und klinische Bedeutung des Humanen Zytomegalievirus (HCMV)	3
2.2	Struktur des HCMV	4
2.2.1	Morphologie des Viruspartikels.....	4
2.2.2	Struktur des Virusgenoms.....	5
2.3	Viraler Infektionszyklus.....	6
2.4	Das IE1-72kDa-Protein.....	8
2.5	Die antivirale Antwort der Zelle	10
2.5.1	Die Funktion und Aktivierung von Interferonen	10
2.5.2	Signalweiterleitung durch IFN – Die Jak-STAT-Signalkaskade.....	12
2.5.3	HCMV und die antivirale Antwort der Zelle.....	15
2.6	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Antikörper	17
3.1.1	Primärantikörper	17
3.1.2	Sekundärantikörper	19
3.2	Oligonukleotide und Plasmide	20
3.2.1	Oligonukleotide.....	20
3.2.2	Plasmide	22
3.3	Zellen und Viren	24
3.3.1	<i>E. coli</i> -Stämme.....	24
3.3.2	Humane Zelllinien	24
3.3.3	HCMV-Stämme	25
3.4	Nukleinsäure-Methoden.....	26
3.4.1	Isolierung von RNA und reverse Transkription in Einzelstrang-cDNA.....	26
3.4.2	Quantifizierung von RNA und DNA durch Echtzeit-PCR	26
3.4.3	Herstellung von internen IE1-Deletionsmutanten	28
3.5	Protein-Methoden	30
3.5.1	Expression und Reinigung von Proteinen.....	30

3.5.2	Gewinnung von Gesamtzellextrakten	31
3.5.3	Subzelluläre Fraktionierung	32
3.5.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot-Analyse	33
3.5.5	<i>In vitro</i> -Bindungstest	34
3.5.6	Koimmunpräzipitation	35
3.5.7	Chromatinimmunpräzipitation	36
3.5.8	Immunfluoreszenzmikroskopie	37
3.6	Zellkulturverfahren, Transfektionen und Infektionen	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Bedeutung von IE1 für die IFN-Resistenz des HCMV	40
4.2	Einfluß des HCMV IE1-Proteins auf die ISG-Induktion	41
4.2.1	Blockierung der ISG-Induktion durch HCMV IE1 im Infektionsverlauf....	41
4.2.2	Blockierung der ISG-Induktion durch HCMV IE1 außerhalb des Viruskontextes	44
4.3	Einfluss von IE1 auf die Gleichgewichtsmengen, die Aktivierung und die nukleäre Translokation von Komponenten des ISGF3-Komplexes	45
4.3.1	IE1 beeinflusst nicht die Expression und Aktivierung der ISGF3- Komponenten	45
4.3.2	IE1 verhindert nicht die nukleäre Translokation der ISGF3-Komponenten	46
4.4	Intranukleäre Effekte von IE1 auf ISGF3-Komponenten	48
4.4.1	Einfluss von IE1 auf die subnukleäre Verteilung der ISGF3-Komponente.	48
4.4.2	IE1 verhindert die DNA-Assoziation des ISGF3	51
4.4.3	Subnukleäre Kolokalisation und physikalische Wechselwirkung zwischen IE1 und Proteinen des ISGF3-Komplexes	52
4.4.3.1	Kolokalisation von IE1 mit STAT1, STAT2 und IRF9	52
4.4.3.2	Physikalische Interaktion zwischen IE1 und STAT1/STAT2	56
4.4.3.3	Wechselseitige Abhängigkeit der IE1-STAT-Interaktionen	58
4.5	Bestimmung der Interaktionsdomänen im IE1- und STAT2-Protein	60
4.5.1	Für die subnukleäre Kolokalisation mit STAT2 wichtige Bereiche im IE1- Protein	63
4.5.2	Für die Bindung an STAT2 wichtige Bereiche im IE1-Protein	68
4.5.3	Für die Interaktion mit IE1 wichtige Bereiche im STAT2-Protein	70

5	Diskussion	74
5.1	Die Koevolution zwischen der IFN-vermittelten Immunantwort und dem HCMV	74
5.2	Das HCMV IE1-Protein und die Phase 1 der IFN-Antwort	74
5.3	Das HCMV IE1-Protein und die Phase 2 der IFN-Antwort	76
5.3.1	Blockierung der ISG-Induktion durch IE1	76
5.3.2	Einfluss des IE1-Proteins auf die Akkumulation, Aktivierung und nukleäre Translokation der ISGF3-Komponenten.....	78
5.3.3	Einfluss des IE1-Proteins auf die subnukleäre Verteilung und DNA-Bindung von STAT1, STAT2 und IRF9.....	79
5.3.4	Physikalische Interaktion des IE1-Proteins mit dem STAT-Heterodimer...	82
5.4	Strukturanalysen zur Interaktion zwischen IE1 und STAT2	83
5.4.1	Das HCMV IE1-Protein und relevante Interaktionsdomänen	83
5.4.2	Das zelluläre STAT2-Protein und relevante Interaktionsdomänen	85
5.5	Modell und Ausblick.....	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	100
8	Abkürzungsverzeichnis	102
9	Veröffentlichungen	105

1 Zusammenfassung

Wirbeltiere haben als Teil der angeborenen Immunabwehr im Laufe der Evolution ein höchst komplexes Interferon (IFN)-System entwickelt, welches das Potenzial besitzt Infektionen mit Viren und anderen Pathogenen zu unterbinden. Im Gegenzug dazu haben Viren wie das humane Zytomegalievirus (HCMV) zahlreiche Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen der IFN-Antwort zu entkommen und im Wirtsorganismus zu persistieren. Die antivirale Immunantwort, die über Sekretion von Typ 1 IFN zur Induktion IFN-stimulierter Gene (ISG) führt, wird in zwei Phasen unterteilt. In Phase 1 lösen bereits die ersten Virus-Zell-Kontakte eine Reihe von molekularen Ereignissen aus, die in der Induktion des IFN- β -Gens münden. Sezerniertes IFN- β aktiviert dann, durch Bindung an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche, den so genannten *janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (Jak-STAT)-Signaltransduktionsweg (Phase 2). Der im Kontext dieser Signalkaskade aus den Proteinen STAT1, STAT2 und IFN *regulatory factor 9* (IRF9) gebildete trimere Komplex führt nach Phosphorylierung, nukleärer Translokation und sequenzspezifischer DNA-Bindung letztendlich zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher antiviraler Gene.

Es wurde postuliert, dass mindestens ein unmittelbar nach Infektion neu synthetisiertes HCMV-Genprodukt die Induktion dieser ISG unterdrücken kann. Die ersten nach HCMV-Infektion produzierten viralen Genprodukte werden in der Klasse der *immediate-early* (IE)-Proteine zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern das virale 72kDa IE1-Protein diese Aufgabe übernimmt und welcher molekulare Mechanismus dieser Aktivität gegebenenfalls zugrunde liegt.

Durch vergleichende Wachstumsanalysen mit einem Wildtyp-Virus und einer IE1-defizienten Virusmutante konnte zunächst gezeigt werden, dass die HCMV-Infektion in primären humanen Fibroblasten durch virusinduziertes IFN- β normalerweise nicht limitiert wird. In Anwesenheit des IE1-Proteins zeigte das Virus auch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber relativ hohen Konzentrationen an zusätzlich exogen zugesetztem IFN, während sich die IE1-spezifische Virusmutante als IFN-hypersensitiv erwies.

Desweiteren wurde beobachtet, dass IE1 nur unwesentlich in die Phase 1 der IFN-abhängigen Immunantwort eingreift. Dagegen konnte gezeigt werden, dass das virale Protein die Induktion von mindestens zwei IFN-stimulierten, potenziell antiviralen humanen Transkripten im weiteren Verlauf der Infektion (Phase 2 der IFN-Antwort)

effizient unterdrücken kann. Die reprimierenden Effekte von IE1 waren dabei unabhängig von anderen HCMV-Genprodukten.

An Hand von Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das virale Protein weder die Gleichgewichtsmengen, noch den Phosphorylierungsstatus oder die nukleäre Translokation von STAT1, STAT2 oder IRF9 negativ beeinflusst. Dagegen konnte mit Hilfe von subzellulären Fraktionierungsverfahren eine IE1-abhängige Retention von aktiviertem STAT1 und STAT2 im Zellkern nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine spezifische Kolo-kalisation zwischen IE1 und den Komponenten des trimeren Komplexes im Zellkern beobachtet, die auf eine subnukleäre Sequestrierung und Delokalisation der zellulären Proteine durch IE1 hindeutet. Dementsprechend zeigten Chromatinimmunpräzipitationen, dass IE1 mit der sequenzspezifischen DNA-Assoziation von STAT1, STAT2 und IRF9 an Promotoren von ISG interferiert.

Schließlich konnte durch Koimmunpräzipitationen aus infizierten Zellen und durch *in vitro*-Bindungsversuche eine physikalische Wechselwirkung zwischen dem IE1-Protein und STAT2 demonstriert werden. Während es sich bei der IE1-STAT2-Bindung vermutlich um eine direkte Wechselwirkung handelt, wurde für STAT1 eine indirekte Interaktion über STAT2 nachgewiesen. Zwischen IE1 und IRF9 war dagegen keine Bindung nachweisbar. Der für die physikalische Wechselwirkung mit STAT2 benötigte Bereich im IE1-Protein wurde auf eine 37 Aminosäuren umfassende Hauptinteraktionsdomäne im carboxyterminalen Abschnitt des viralen Proteins eingegrenzt. Für den zellulären Interaktionspartner erwiesen sich Abschnitte im aminoterminalen Bereich und in der zentralen DNA-Bindedomäne als kritisch für die Kolo-kalisation mit dem IE1-Protein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass die IFN-Resistenz des HCMV in maßgeblicher Weise durch das virale IE1-Protein bestimmt wird. Die Induktion IFN-induzierter antiviraler Gene wird dabei über einen einzigartigen intranukleären Mechanismus blockiert.

2 Einleitung

2.1 Taxonomie und klinische Bedeutung des Humanen Zytomegalievirus (HCMV)

Die Familie der Herpesviren zeichnet sich durch eine ubiquitäre Verbreitung sowohl bei Tieren als auch beim Menschen aus. Von den über 100 bekannten Herpesviren gelten bisher allerdings nur acht Vertreter als humanpathogen. Aufgrund unterschiedlicher biologischer Eigenschaften wie Wirtsspezifität, Vermehrungszyklus, Zytopathologie und Ort ihrer Persistenz, werden die *Herpesviridae* in die Subfamilien α -, β -, und γ -*Herpesvirinae* unterteilt (Roizman & Baines, 1991).

Das HCMV gilt als einer der wichtigsten Vertreter der β -*Herpesvirinae*. Mitglieder dieser Familie zeichnen sich unter anderem durch eine strikte Wirtsspezifität und einen langsamen Replikationszyklus in Zellkultur aus (Ho, 1991; Mocarski, 1993). Die Infektion mit HCMV führt zu einer Vergrößerung der betroffenen Zellen (Zytomegalie [griech. *kytos*: Zelle; *megas*: groß]) mit charakteristischen Einschlusskörperchen. Diese zytopathischen Erscheinungsbilder führten zu der Namensgebung des Virus (Weller *et al.*, 1960). Die Verbreitung von HCMV variiert je nach Bevölkerungsdichte und hygienischen Umständen und liegt in Industrieländern bei 40-60% (Mocarski *et al.*, 2007). Das Virus wird über Tröpfchen- oder Kontaktinfektion durch fast alle Körpersekrete übertragen. Eine Primärinfektion bei gesunden Individuen verläuft in der Regel asymptomatisch und führt, ähnlich wie bei anderen Herpesviren, zu einer lebenslangen Persistenz des Virus, die von regelmäßigen Reaktivierungen gekennzeichnet ist. In seltenen Fällen kann es zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild kommen (Cohen & Corey, 1985). Bei immungeschwächten Personen, wie z. B. AIDS- und Transplantationspatienten, oder während der Tumorthherapie kann eine Reaktivierung des HCMV dagegen schwere Komplikationen bis hin zu lebensbedrohlichen Krankheiten verursachen (Mocarski *et al.* 2007).

Von großer klinischer Bedeutung ist außerdem die Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind *in utero*. HCMV stellt die häufigste infektiöse Ursache für Geburtsdefekte dar und zeigt bei kongenitalen Infektionen eine Prävalenz zwischen 0,15 und 2% (Malm & Engmann, 2007). Die Primärinfektion der Mutter oder die Reaktivierung

des Virus während der Schwangerschaft kann zu schweren Spätschäden, wie z. B. Schwerhörigkeit oder zentralnervösen Schädigungen des Kindes führen (Harris *et al.*, 1984; Pass, 2001; Damato & Winnen, 2002). Des Weiteren wird HCMV in letzter Zeit immer häufiger mit der Entstehung von verschiedenen Tumoren und Gefäßerkrankungen in Verbindung gebracht (Melnick *et al.*, 1993 und 1994; Cinatl *et al.*, 1996; Cobbs *et al.*, 2002; Cinatl *et al.*, 2004a und 2004b).

2.2 Struktur des HCMV

2.2.1 Morphologie des Viruspartikels

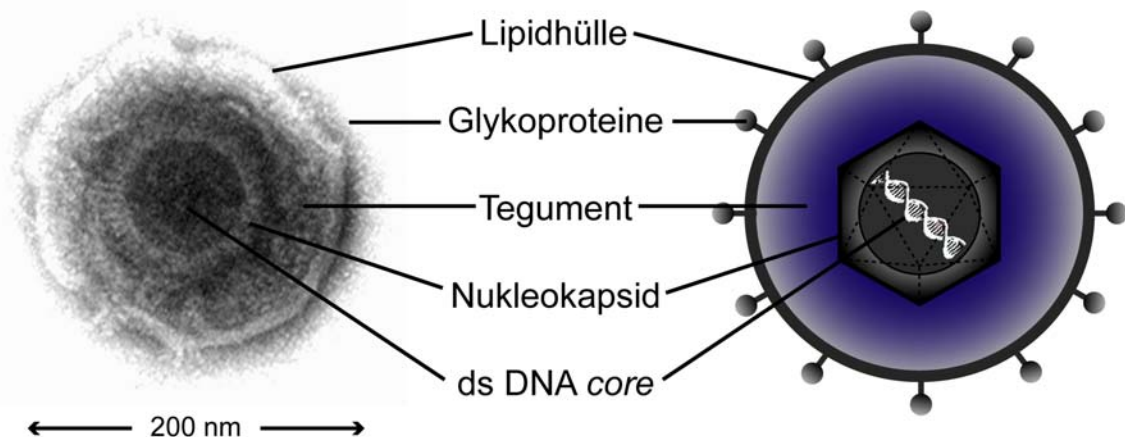


Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines HCMV-Partikels. Das Virus ist von einer Lipiddoppelschicht mit eingebetteten viralen Glykoproteinen umhüllt. Darunter befindet sich das Tegument, eine amorphe Proteinmatrix zwischen Lipidhülle und Nukleokapsid. Das ikosaedrische Nukleokapsid enthält das doppelsträngige DNA (ds DNA)-Genom.

HCMV-Partikel besitzen einen Durchmesser von 150-200 nm (Abb. 2.1). Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom ist mit einer fibrillären Proteinmatrix zu einem so genannten *core* organisiert und findet sich eingebettet in ein ikosaedrisches Nukleokapsid, welches aus 162 Kapsomeren besteht und einen Durchmesser von ca. 130 nm aufweist (Butcher *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999). Das Nukleokapsid wird von einer aus ca. 25 verschiedenen Proteinen bestehenden Proteinmatrix, dem so genannten Tegument umgeben. Dieses Kompartiment beinhaltet neben den meisten Virion-Proteinen eine Auswahl an viralen und zellulären RNAs und macht etwa 40% der Gesamtmasse des Virions aus (Terhune *et al.*, 2004; Mocarski *et al.*, 2007). Nach außen wird die Tegumentschicht durch eine Lipid-

Doppelmembran zellulären Ursprungs abgegrenzt. In diese Lipidhülle sind mindestens acht verschiedene virale Glykoproteine eingelagert. Das Glykoprotein B (gB) stellt eines der am stärksten konservierten Proteine innerhalb der Herpesviren dar. Es vermittelt als häufigstes Membranprotein der Virushülle die Anheftung des Viruspartikels an die Wirtszelle und gilt zudem als höchst immunogen (Britt & Mach, 1996; Mocarski *et al.*, 2007).

2.2.2 Struktur des Virusgenoms

Das HCMV-Genom zählt mit über 230 kb zu den größten und komplexesten viralen Genomen und kodiert für mehr als 200 Proteine (Chee *et al.*, 1990; Bankier *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 2003a und 2003b). Die Unterteilung erfolgt wie bei anderen Herpesviren in zwei nicht-repetitive Abschnitte, eine lange U_L (*unique long*)- und eine kurze U_S (*unique short*)-Region, die beide von repetitiven Sequenzen flankiert werden (Abb. 2.2; Roizman, 1979; Stinski, 1983). Die U_L -Region wird flankiert von der terminalen repetitiven Sequenz TR_L (*terminal repeat long*) und der invertierten internen Sequenz IR_L (*internal repeat long*), die U_S -Region entsprechend von den Sequenzen TR_S (*terminal repeat short*) und IR_S (*internal repeat short*). Sowohl an den beiden Genomenden als auch zwischen IR_L und IR_S befinden sich so genannte a/a'-Sequenzen variabler Länge und unterschiedlicher Kopienzahl (Abb. 2.2; Mocarski *et al.*, 1987). Durch Rekombination dieser Sequenzabschnitte kann es zu vier verschiedenen Isoformen des Genoms kommen, welche in jeder Viruspopulation in äquimolarer Verteilung auftreten (Hayward *et al.*, 1975). Basierend auf dieser Nomenklatur der Genomabschnitte werden die entsprechenden viralen Gene mit den Präfixen UL, US, TR oder IR bezeichnet (Spaete *et al.*, 1994).

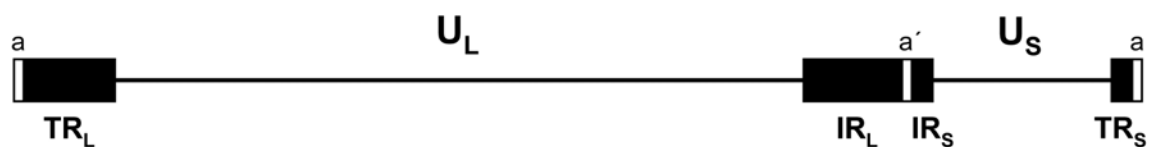


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der HCMV-Genomorganisation. Das Genom des HCMV besteht aus zwei nicht repetitiven Regionen, dem U_L (*unique long*)- und dem U_S (*unique short*)-Segment, die an den Enden von repetitiven Sequenzen, den *terminal repeats* (TR) und den *internal repeats* (IR) flankiert werden. Die Sequenzen a und a' liegen invertiert zueinander vor und sind an der Genomisomerisierung beteiligt.

2.3 Viraler Infektionszyklus

Da HCMV ein breites Spektrum an Zellen infizieren kann wird vermutet, dass mehrere unterschiedliche Rezeptoren oder/und ubiquitär exprimierte Oberflächenmoleküle für die Aufnahme des Virus verantwortlich sind. Diesbezüglich wurden u. a. der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) sowie Integrin $\alpha\beta 3$ als Korezeptoren diskutiert (Wang *et al.*, 2003 und 2005). Spätere Arbeiten konnten die Beteiligung von EGFR jedoch nicht bestätigen, sodass der genaue Aufnahmeweg vorerst unbekannt bleibt (Isaacson *et al.*, 2007). Der erste Kontakt zur Wirtszelle wird durch das virale Glykoprotein gB über unspezifische Bindung an Heparansulfatproteoglykane vermittelt und zusätzlich durch wirtseigenes β_2 -Mikroglobulin unterstützt (Grundy *et al.*, 1987; Compton *et al.*, 1993; Boyle & Compton, 1998). Nach Adsorption des Virus an die Zielzelle kommt es zur pH-unabhängigen Fusion der Virusmembran mit der Zytoplasmamembran (Bold *et al.*, 1996; Lopper & Compton, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass das hierbei freigesetzte Nukleokapsid mit dem zellulären Mikrotubuli-Netzwerk assoziiert (Ogawa-Goto *et al.*, 2003). Für das Herpes Simplex Virus (HSV) sind ähnliche Transportmechanismen schon länger bekannt, die letztendlich zur Anheftung des Kapsids an den Kernporenkomplex führen. Von dort aus wird die virale DNA ins Nukleoplasma freigesetzt (Sodeik *et al.* 1997, Ojala *et al.*, 2000). Für das HCMV wird ein vergleichbarer Mechanismus vermutet. Im Kern kommt es zur Zirkularisierung der DNA, die somit in episomaler Form vorliegt und nach dem Prinzip des *rolling circle* repliziert wird (McVoy & Adler, 1994).

Die Transkription der HCMV-Gene erfolgt mit Hilfe der zellulären RNA Polymerase II. Als ein weiteres Charakteristikum aller Herpesviren ist die kaskadenartig ablaufende Genexpression anzusehen. Der zeitliche Ablauf der Genexpression ist in drei Phasen eingeteilt, eine „sehr frühe“ (*immediate early*, IE)-, eine „frühe“ (*early*, E)- und eine „späte“ (*late*, L)-Phase (Abb. 2.3). Sobald das virale Genom ins Nukleoplasma entlassen worden ist, erfolgt die Expression der IE-Gene, die auf vier verschiedene Regionen des HCMV-Genoms verteilt sind: UL36-37, UL122-123 (IE1 und IE2), US3 sowie TRS1 und IRS1 (Mocarski *et al.*, 2007). Die IE-Gene codieren für die ersten viralen Proteine, die in der infizierten Zelle synthetisiert werden. Ihre Transkription ist unabhängig von einer *de novo* Synthese viraler und zellulärer Proteine und wird durch zelluläre Transkriptionsaktivatoren sowie durch Faktoren des infizierenden Viruspartikels, einschließlich der Tegumentproteine pp71 (UL82) und UL69, reguliert. Die Transkription der IE1/IE2-Gene steht unter der Kontrolle des *major* IE-Promotors (MIEP), einem der

stärksten in eukaryotischen Zellen aktiven Promotoren. Zusätzlich übernehmen IE1 und IE2 eine autoregulatorische Rolle bei der Aktivierung des MIEP. Die Hauptfunktion dieser beiden IE-Genprodukte besteht jedoch in der Aktivierung der E- und der L-Genexpression (Stinski & Meier, 2006).

In der „frühen“ oder E-Phase der Virusvermehrung steht die Synthese von Proteinen, die für die DNA-Replikation benötigt werden, im Vordergrund. An der DNA-Replikation sind mindestens 23 verschiedene virale Genprodukte beteiligt. Davon codieren sechs für evolutionär konservierte Proteine innerhalb der Herpesviren. Hierzu zählen z. B. die zwei Untereinheiten der viralen DNA-Polymerase, die katalytische Untereinheit (UL54) und der Prozessivitätsfaktor (UL44) (Mocarski *et al.*, 2007).

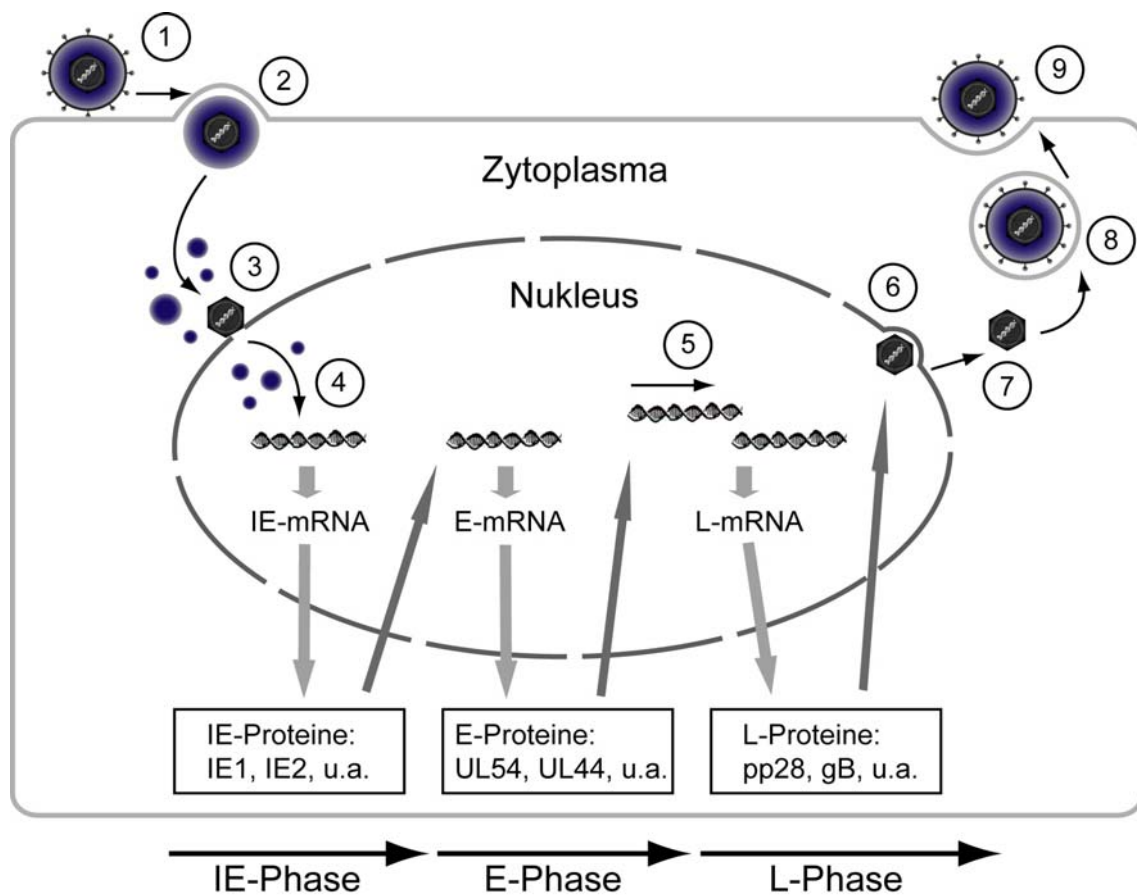


Abb. 2.3: Infektionszyklus des HCMV. Schematisch vereinfachte Darstellung des Infektionsverlaufs mit kaskadenartiger Genexpression. (1) Adsorption des Virus. (2) Fusion mit der Zytoplasmamembran und Freisetzung von Kapsid und Tegument ins Zytoplasma. (3) Andocken des Kapsids an den Kernporenkomplex. (4) Freisetzung der DNA mit anschließender kaskadenartiger Genexpression unter Beteiligung von Tegument-Proteinen. (5) Replikation der DNA und Einsetzen der L-Phase. (6) Knospung an der inneren Kernmembran in den perinukleären Raum → erste Hüllmembran. (7) Freisetzung an der äußeren Kernmembran unter Verlust der Hülle. (8) Finale Behüllung an Membranen des *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC). (9) Freisetzung des reifen Viruspartikels über Exozytose.

Nach Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt die so genannte „späte“ oder L-Phase des Infektionszyklus. Die in dieser Phase exprimierten Gene codieren hauptsächlich für Strukturproteine aber auch für Komponenten/Regulatoren der Kapsidreifung und der DNA-Verpackung. Die „späten“ Genprodukte tragen somit zur Virionmorphogenese und späteren Freisetzung der fertigen Viruspartikel aus der Zelle bei (Mocarski *et al.*, 2007).

Die Reifung der Viruspartikel beginnt mit der Zusammensetzung des Nukleokapsids im Kern, an der mindestens sechs Herpesvirus-konservierte Proteine beteiligt sind (Gibson, 2006). Nach der Verpackung der neu synthetisierten DNA in Nukleokapside werden diese an der inneren Kernmembran umhüllt und gelangen somit in den perinukleären Raum (Radsak *et al.*, 1989). Diese erste Hülle geht im Anschluss durch Fusion mit der äußeren Kernmembran wieder verloren, wobei die Nukleokapside ins Zytoplasma freigesetzt werden. Eine zweite, finale Hülle erhalten die Kapside an Membranen eines Kompartiments zwischen Endoplasmatischem Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat, dem so genannten *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) (Tooze *et al.*, 1993; Britt, 2006). Durch Abschnürung von Transportvesikeln entstehen somit Kapside mit einer doppelten Lipidhülle (Abb. 2.3). Es wird angenommen, dass das reife Virion über Exozytose an die Zelloberfläche transportiert wird. Dabei kommt es zur Fusion der äußeren Hülle mit der Zytoplasmamembran, sodass letztendlich einfach umhüllte, reife Viruspartikel freigesetzt werden (Britt, 2006).

2.4 Das IE1-72kDa-Protein

Ausgehend von einem Primärtranskript, entstehen unter der Kontrolle des MIEP durch differentielles Spleißen zwei IE-Haupttranskripte, IE1 und IE2, die für das IE1-72kDa- und das IE2-86kDa-Protein codieren (Mocarski *et al.*, 2007). Das IE1-Protein wird hierbei von den Exons 2 bis 4 codiert, wohingegen die codierende Sequenz für IE2 in den Exons 2, 3 und 5 liegt (Abb. 2.4). Zusätzlich werden durch alternatives Spleißen kleinere Produkte wie IE1-19kDa, IE2-55kDa und IE2-18kDa gebildet, deren Bedeutung bisher jedoch weitestgehend unbekannt ist. Neben der bereits erwähnten Aktivierung der Gene der E- und der L-Phase, unterscheiden sich die IE1- und IE2-Genprodukte bezüglich ihrer regulatorischen Eigenschaften am MIEP. Während IE1-72kDa einen rein transaktivierenden Einfluss auf den MIEP hat, kann IE2-86kDa den MIEP im späteren Verlauf der Infektion reprimieren (Stinski & Meier, 2006; Mocarski *et al.*, 2007).

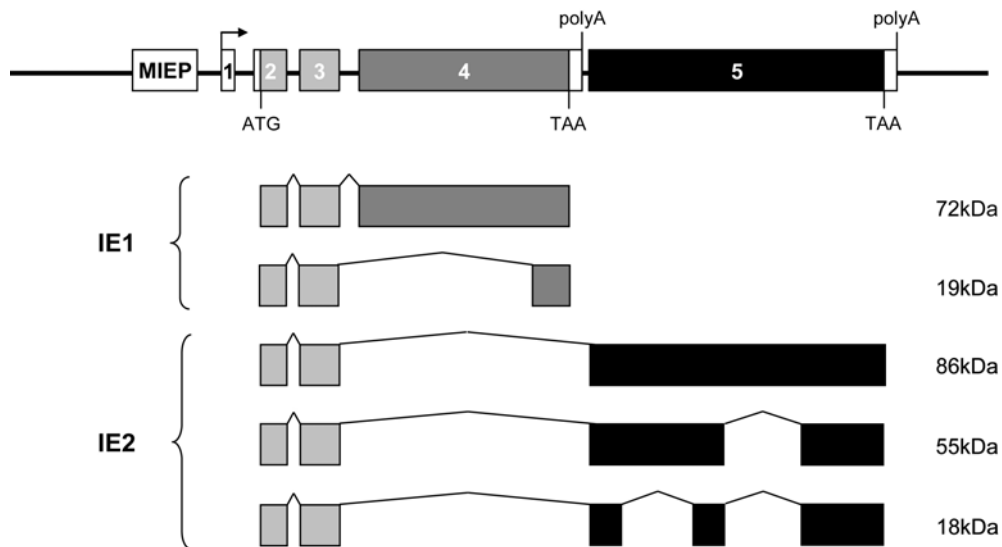


Abb. 2.4: Die *major* IE-Region. Das Schema zeigt die Exons 1 bis 5 unter der Kontrolle des *major* IE-Promotors (MIEP). In grau und schwarz sind die codierenden Bereiche mit dem Startcodon (ATG), den Stopcodons (TAA) und den Polyadenylierungsstellen (polyA) dargestellt. Das IE1-Protein wird von den Exons 2 bis 4 codiert, IE2 von Exon 2, 3 und 5. Zusätzlich abgebildet sind die kleineren Nebenprodukte von IE1 (19kDa) und IE2 (55 und 18kDa).

Das erste und abundanteste IE-Genprodukt während der Infektion ist das IE1-72kDa-Protein. Das Protein kann durch Phosphorylierung und SUMOylierung posttranslational modifiziert werden (Poma *et al.*, 1996; Pajovic *et al.*, 1997; Spengler *et al.*, 2002; Nevels *et al.*, 2004a). Die Modifikationen finden fast ausschließlich im sauren, carboxyterminalen Bereich des IE1-Proteins statt. Dieser Abschnitt zeichnet sich durch eine charakteristische Domänenstruktur aus (Reinhardt *et al.*, 2005). Hierzu zählen die Anhäufung von sauren Aminosäuren (Glutamin- und Asparaginsäure) in bestimmten Teilbereichen und ein Serin/Prolin-reiches Motiv, welche die Aktivität des Proteins unterschiedlich beeinflussen (Pajovic *et al.*, 1997; Castillo & Kowalik, 2002; Reinhardt *et al.*, 2005). Aufgrund seiner Funktion als allgemeiner Transaktivator kann IE1 neben viralen Genen auch zahlreiche zelluläre Gene aktivieren (Mocarski *et al.*, 2007). Für die IE1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung sind vermutlich Modifikationen des zellulären Chromatins notwendig. So konnte gezeigt werden, dass HCMV der transkriptionellen Repression durch Histondeacetylasen (HDAC) entgegenwirken kann. Die Interaktion von IE1 mit HDAC3 führt dabei zu einer Aktivierung der viralen Transkription (Nevels *et al.*, 2004b). IE1 ist typischerweise im Kern der Wirtszelle lokalisiert (Castillo & Kowalik, 2002; Nevels *et al.*, 2004a). Hier kommt es zu einer transienten Kolokalisation des viralen Proteins mit subnukleären, interchromatinischen Strukturen, den so genannten PML (*promyelocytic leukemia*)-Körpern oder ND10 (*nuclear domain 10*). Hierbei handelt es sich um sphärische

Multiproteinkomplexe, die in nahezu allen Zelltypen vorkommen. Im Verlauf der Infektion werden diese Strukturen von IE1 vollständig aufgelöst (Kelly *et al.*, 1995; Koriath *et al.*, 1996; Ahn & Hayward, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998). Die Fähigkeit mit PML-Körpern zu kolokalisieren und diese aufzulösen konnte bestimmten Sequenzen innerhalb der carboxyterminalen, sauren Domäne des IE1-Proteins zugeschrieben werden (Ahn & Hayward, 1997; Ahn *et al.*, 1998). Man vermutet, dass PML-Körper an zahlreichen zellulären Prozessen, wie z. B. der DNA-Schadensantwort, der Stressantwort, der Apoptose und der Interferon-Antwort beteiligt sind (Maul *et al.*, 1995; Regad & Chelbi-Alix, 2001; Bernardi & Pandolfi, 2003; Dellaire & Bazett-Jones, 2004; Everett & Chelbi-Alix, 2007; Tavalai *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das IE1-Protein mit zellulärem Chromatin assoziiert (Lafemina *et al.*, 1989; Nevels *et al.*, 2004b). Die hierfür benötigte so genannte *chromatin tethering domain* (CTD) befindet sich am Ende des carboxyterminalen Abschnittes (Lafemina *et al.*, 1989). Aufgrund der allgemeinen Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins, liegt die Vermutung nahe, dass die beschriebenen Interaktionen mit subnukleären Strukturen in unmittelbarem Zusammenhang mit transkriptioneller Aktivierung stehen (Castillo & Kowalik, 2002). Des Weiteren wird dem viralen Protein anti-apoptotisches, mutagenes, mitogenes und onkogenes Potential zugeschrieben (Shen *et al.*, 1997; Castillo & Kowalik, 2002; Zhu *et al.* 1995). Im Allgemeinen scheint das IE1-Protein im frühen Verlauf der Infektion von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Virusvermehrung zu sein. Das zeigt sich am eindrucksvollsten darin, dass IE1-defiziente Virusmutanten unter „*single hit*“-Bedingungen, d. h. wenn Zellen von jeweils nur einem Viruspartikel infiziert werden (*low multiplicity of infection*, MOI), einen deutlichen Replikationsdefekt aufweisen (Mocarski *et al.*, 1996; Greaves & Mocarski, 1998). Diese Beobachtung ist auf einen generellen Defekt bei der Expression viraler E-Gene zurückzuführen (Gawn & Greaves, 2002).

2.5 Die antivirale Antwort der Zelle

2.5.1 Die Funktion und Aktivierung von Interferonen

Für die erfolgreiche Bekämpfung von Virusinfektionen benötigt der betroffene Organismus das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunantwort. Von entscheidender Bedeutung sind hierbei die Mechanismen der angeborenen Immunantwort die es ermöglichen, dass viele Viren bereits früh erkannt und zerstört werden (Sen, 2001).

Viren induzieren bei betroffenen Zellen verschiedene Signalwege, die durch kaskadenartige Signalweiterleitung eine schnelle Induktion zahlreicher antiviraler Gene zur Folge haben. Für die Weiterleitung der Signale werden Botenstoffe benötigt, die spezifische Signalkaskaden induzieren können. Wichtige Botenstoffe sind hierbei die Interferone (IFN), eine Gruppe von Zytokinen, die ihren Namen aufgrund ihrer Interferenz mit der viralen Replikation in infizierten Hühnereiern erhalten haben (Isaacs & Lindenmann, 1957; Sen & Lengyel, 1992). Neben der antiviralen Aktivität besitzen IFN zusätzlich zytostatische, pro-apoptotische sowie immunmodulatorische Eigenschaften (Meager, 2002; Clemens, 2003). IFN sind kleine Proteine oder Glykoproteine (ca. 20 kDa) und werden in zwei Gruppen unterteilt, die Typ 1 und die Typ 2 IFN. Der einzige Vertreter der Typ 2 IFN ist das IFN- γ , das vor allem von aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert wird (Boehm *et al.*, 1997). Zur Gruppe der humanen Typ 1 IFN werden derzeit IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω gezählt, wobei IFN- α und IFN- β bisher am besten untersucht wurden (Roberts *et al.*, 1998; Pestka *et al.*, 2004; LaFleur *et al.*, 2001; Takaoka & Yanai, 2006). Die größten Mengen an Typ 1 IFN (v. a. IFN- α) werden nach Virusinfektion von so genannten plasmazytoiden dendritischen Zellen produziert (Krug *et al.*, 2001). IFN- β , das auch als Fibroblasten-IFN bekannt ist, wird zusätzlich von einigen anderen Zelltypen produziert (Sen, 2001). Die Summe an funktionalen humanen IFN-Genen beinhaltet 13 verschiedene Gene für IFN- α und nur eines für IFN- β (Sehgal, 1982; Henco *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1998).

Die infektionsbedingte Aktivierung der Expression von Typ 1 IFN kann in Abhängigkeit vom Virustyp variieren. Meist sind jedoch erste Virus-Zell-Kontakte, z. B. über strukturelle Viruskomponenten wie Glykoproteine, für eine IFN-Induktion verantwortlich (Malmgaard, 2004). Oftmals sind auch virale Nukleinsäuren ein Stimulus für die Aktivierung der IFN-Expression. Bei RNA-Viren können z. B. einzelsträngige RNA-Moleküle über so genannte *toll like*-Rezeptoren zu einer Induktion von IFN führen (Takeda & Akira, 2005). Bei DNA-Viren können zusätzlich Intermediate, wie doppelsträngige RNA, eine Aktivierung von IFN-Genen induzieren (Malmgaard, 2004).

Die frühe antivirale Antwort der Zelle wird in zwei Phasen eingeteilt. In der ersten, akuten, IFN-unabhängigen Phase kommt es zur Induktion ausgewählter IFN-stimulierter Gene (ISG) und zur Produktion von Typ 1 IFN (Grandvaux *et al.*, 2002). Bereits der erste Kontakt des Virus mit der Zytoplasmamembran der Zelle führt zur Aktivierung (Phosphorylierung) des konstitutiv exprimierten IFN regulatorischen Faktors 3 (IRF3), einem Transkriptionsaktivator aus der IRF-Familie (Au *et al.*, 1995; Schafer *et al.*, 1998;

Hiscott *et al.*, 1999). Aktiviertes IRF3 transloziert in den Zellkern und induziert dort, unter Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren, das IFN- β -Gen sowie ausgewählte ISG (Lin *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998b; Yoneyama *et al.*, 1998; Suhara *et al.*, 2002; Nakaya *et al.*, 2001). Hierdurch kommt es in der ersten Phase zur Sekretion von geringen Mengen an IFN- β (Wathelet *et al.*, 1998). Die zweite, verzögerte, IFN-abhängige Phase wird durch Typ 1 IFN induziert, welches in der ersten Phase freigesetzt wurde. Sezerniertes IFN- β kann nun durch autokrine oder parakrine Wirkung eine weitere Signalkaskade, den so genannten *janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (Jak-STAT)-Signaltransduktionsweg (Schindler, 1999) induzieren (Abb. 2.5). Die Folge ist u. a. die Expression von IRF7, dessen Aktivität entsprechend IRF3 durch virusinduzierte Phosphorylierung reguliert wird (Nakaya *et al.*, 2001). Der Synergismus von IRF3 und IRF7 führt zu einer maximalen Expression und Sekretion von IFN- β sowie der verschiedenen IFN- α -Genprodukte (Au *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000). Diese positive Rückkopplung verstärkt das IFN-Signal und ermöglicht der Zelle den Aufbau eines antiviralen Status (Marie *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998a).

2.5.2 Signalweiterleitung durch IFN – Die Jak-STAT-Signalkaskade

Durch Bindung von sezerniertem Typ 1 IFN an den entsprechenden IFN- α/β -Rezeptor (IFNAR) kommt es zur Dimerisierung der beiden Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2 (Mogensen *et al.*, 1999). Diese Heterodimersierung des Rezeptors führt zur Phosphorylierung zweier zytoplasmatischer, rezeptorassoziierter Tyrosinkinasen, Janus-Kinase 1 (Jak1) und Tyrosin-Kinase 2 (Tyk2) (Colamonici *et al.*, 1994; Novick *et al.*, 1994; Ihle, 1995), die wiederum IFNAR1 selbst phosphorylieren. Die phosphorylierte Untereinheit des Rezeptors dient als Bindestelle zweier Transkriptionsaktivatoren, den STAT-Proteinen STAT1 und STAT2, die ebenfalls durch eine der Tyrosinkinasen phosphoryliert werden (Krishnan *et al.*, 1998). Daraufhin heterodimerisieren die STAT-Proteine über ihre so genannte Src-Homologie 2 (SH2) Domäne (Ihle & Kerr, 1995; Schindler & Darnell, 1995; Gupta *et al.*, 1996; Goodbourn *et al.*, 2000). Zusammen mit einem dritten Faktor, IRF9, bilden die STAT-Proteine den trimeren ISGF3 (IFN-*stimulated gene factor 3*)-Komplex, der anschließend in den Zellkern transloziert. Hier bindet der ISGF3-Komplex in den Promotoren von ISG an so genannte IFN-*stimulated response elements* (ISRE) (Darnell *et al.*, 1994; Stark *et al.*, 1998; Schindler, 1999; Aaronson & Horvath, 2002) (Abb. 2.5).

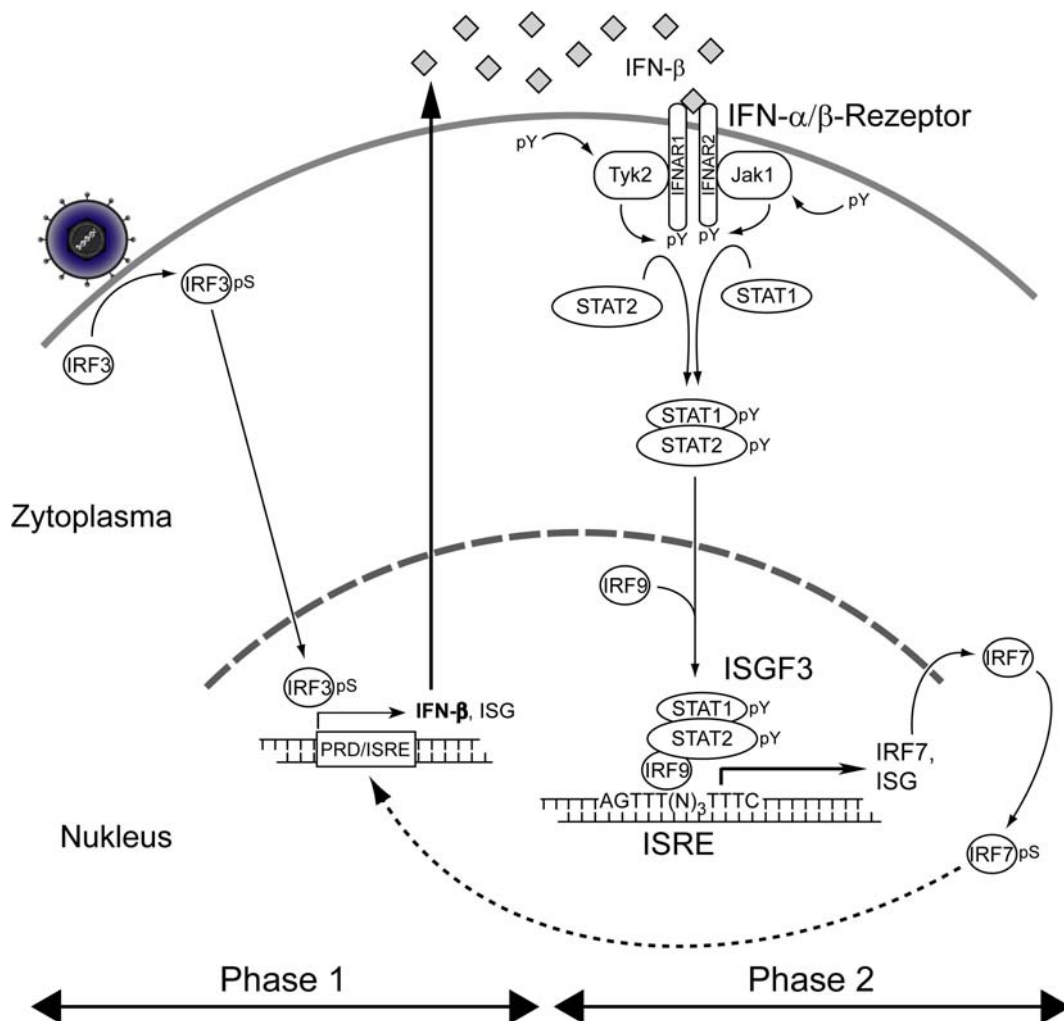


Abb. 2.5: Angeborene antivirale IFN-Antwort der Zelle. Die antivirale IFN-Antwort der Zelle ist in zwei Phasen unterteilt. Die Adsorption des Virus an der Zelloberfläche löst bereits die Aktivierung des IFN regulatorischen Faktors 3 (IRF3) aus. IRF3 wird phosphoryliert, transloziert in den Zellkern und aktiviert dort, neben einigen IFN-stimulierten Genen (ISG), den IFN-β-Promotor, was zu einer Sezernierung von wenig IFN-β führt (Phase 1). Das freigesetzte IFN-β bindet an den IFN-α/β-Rezeptor und aktiviert somit die Jak-STAT-Signalkaskade. Hierdurch kommt es zur Phosphorylierung der zwei rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen Jak1 und Tyk2, die den Rezeptor selbst, sowie STAT1 und STAT2 phosphorylieren. Die Tyrosin-phosphorylierten STAT1- und STAT2-Proteine heterodimerisieren, translozieren in den Nukleus und bilden dort zusammen mit IRF9 den trimeren ISGF3-Komplex. Der ISGF3 bindet an so genannte ISRE in den Promotoren von ISG. Zu den ISG zählt auch IRF7, welches in aktiver Form selbst an den IFN-β-Promotor binden kann und somit zusätzlich die IFN-β-Produktion stimuliert (Phase 2). IFNAR1 und IFNAR2, Untereinheiten des IFN-α/β-Rezeptors; PRD, positive regulatorische Domäne; pY, phosphoryliertes Tyrosin; pS, phosphoryliertes Serin.

Die DNA-Bindung des ISGF3-Komplexes wird primär durch IRF9 vermittelt und durch STAT1 zusätzlich stabilisiert. Für STAT2 konnte dagegen keine stabile DNA-Interaktion festgestellt werden. Stattdessen übernimmt das STAT2-Protein in diesem trimeren Komplex die Rolle des Transaktivators (Bluyssen & Levy, 1997). Da STAT2 nicht nur an

der Typ 1 IFN-Antwort beteiligt ist, sondern mit verschiedenen STAT-Proteinen dimerisieren kann, ist das zelluläre Protein als Transaktivator auch für andere Signalwege von großer Bedeutung (Darnell, 1997).

Um die Verfügbarkeit aktivierbarer STAT-Proteine für Signaltransduktionen zu gewährleisten, müssen diese nach Aktivierung vom Kern zurück ins Zytoplasma gelangen. Hierfür sind Kreisläufe bekannt, die für ein kontinuierliches Pendeln von (inaktiven) STAT-Proteinen zwischen Kern und Zytoplasma verantwortlich sind (Banninger & Reich, 2004; Meyer & Vinkemeier, 2004; Marg *et al.*, 2004; Frahm *et al.*, 2006). Diesbezüglich ist für nicht aktiviertes STAT2 ein langsamer Import bei gleichzeitigem schnellen CRM1 (*chromosome region maintenance 1*)-vermittelten Export beschrieben, was die zytoplasmatische Lokalisation des inaktiven Proteins gewährleistet (Frahm *et al.*, 2006). Durch IFN-Stimulation kommt es zu der oben beschriebenen Heterodimerisierung zytoplasmatischer STAT1/2-Proteine. Die Ausbildung eines Dimer-spezifischen nukleären Lokalisationssignals (NLS) und eine anschließende effiziente Importin-vermittelte nukleäre Translokation ermöglicht die vorwiegend nukleäre Akkumulation aktivierter STAT-Komplexe einschließlich des ISGF3-Komplexes und damit die ISG-Induktion (Melen *et al.*, 2001).

Es sind über 100 ISG bekannt, die für zahlreiche antiviral wirkende Genprodukte codieren. Unter ihnen ist auch das bereits erwähnte IRF7 (Zhou *et al.*, 1998). Zu den bekanntesten ISG zählen die beiden durch dsRNA aktivierten Genprodukte Serin/Threonin-Proteinkinase R (PKR) und die 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) (Garcia *et al.*, 2006; Silverman, 1994). Die PKR spielt eine zentrale Rolle in der antiviralen Antwort, da sie die zelluläre Translationsmaschinerie und somit auch die Synthese viraler Proteine inhibieren kann. Durch OAS kommt es über die Aktivierung der RNase L zu einem Abbau von viraler RNA (Samuel, 2001). Weitere während der Infektion stark induzierte ISG sind die Mx-Proteine (z. B. MxA) sowie ISG15, ISG54 und ISG56 (Larner *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1986; Aebi *et al.*, 1989; Sen, 2001; Haller & Kochs, 2002; Terenzi *et al.*, 2006). Der durch diese Proteine etablierte zelluläre Status hat das Potenzial die virale Replikation effizient zu inhibieren (Samuel, 2001).

2.5.3 HCMV und die antivirale Antwort der Zelle

Im Laufe der Evolution haben Viren zahlreiche Mechanismen entwickelt um die beschriebenen komplexen Prozesse der IFN-vermittelten angeborenen Immunabwehr zu umgehen und damit eine effiziente Virusreplikation zu ermöglichen (Weber *et al.*, 2004; Haller *et al.*, 2007). Auch das HCMV kann durch Blockierung dieser antiviralen Prozesse die Eliminierung durch die Immunabwehr verhindern und somit eine lebenslange Persistenz im Wirt etablieren (Reddehase, 2000; Basta & Bennink, 2003). Es wurde beobachtet, dass das HCMV zu Beginn der Infektion eine Reihe von IFN-stimulierten, antiviralen Genen induziert und dass diese Induktion im weiteren Verlauf der Infektion unterdrückt wird (Browne *et al.*, 2001; Boehme *et al.*, 2004). Die Fähigkeit zur Unterdrückung der zellulären IFN-Antwort beruht vermutlich auf der Aktivität mehrerer viraler Proteine, die bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch weitgehend unbekannt sind (Miller *et al.*, 1998; Le Roy *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999; Zimmermann & Hengel, 2005).

2.6 Zielsetzung

Die Behandlung von HCMV-bedingten Erkrankungen bei Kindern im Mutterleib und immunsupprimierten Patienten stellt in der Medizin immer noch ein großes Problem dar. Trotz umfangreicher Forschung verlief die Entwicklung eines protektiven Impfstoffes in den letzten Jahren wenig erfolgreich. Die derzeitige Therapie mit verschiedenen Virostatika, die sich alle gegen die virale DNA-Polymerase richten, kann die Virusvermehrung zwar in der Regel kontrollieren. Allerdings ist diese Behandlung oftmals mit starken, toxischen Nebenwirkungen assoziiert (Biron, 2006). Zudem können bei fortlaufender Behandlung Mutationen des Virus auftreten, die eine Resistenz gegenüber den eingesetzten Virostatika zur Folge haben (Limaye *et al.*, 2000). Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist das molekularbiologische Studium der komplexen HCMV-Zell-Wechselwirkung von fundamentaler Bedeutung. Dazu gehören auch die molekularen Mechanismen, die es dem Virus ermöglichen, die antivirale IFN-Antwort der Zelle zu umgehen. So könnte der Einsatz von IFN, wie er bei bestimmten virusbedingten Hepatitis-Erkrankungen bereits erfolgreich Anwendung findet, auch bei HCMV-Infektionen Teil einer künftigen Behandlungsstrategie sein.

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der IFN-Resistenz des HCMV näher untersucht werden. Bisherige Untersuchungen legten den Verdacht nahe,

dass hier eines der viralen IE-Proteine eine Schlüsselfunktion übernehmen könnte. Dementsprechend sollte das erste und abundanteste HCMV IE-Protein, IE1-72kDa, auf Interaktionen mit der zellulären IFN-Antwort untersucht werden. Dabei sollte zunächst, nach Infektion humaner Zellen mit spezifischen Virusmutanten und in geeigneten Überexpressionssystemen, überprüft werden, inwiefern das IE1-Protein zur IFN-Resistenz des Virus beiträgt. Im Erfolgsfall sollte dann anschließend analysiert werden, ob IE1 mit der virusvermittelten Induktion antiviraler ISG interferiert und, gegebenenfalls, mit welchen Protein-Komponenten der entsprechenden Signalwege physikalische und funktionelle Interaktionen bestehen.

3 Material und Methoden

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

Die aufgeführten Antikörper wurden vorwiegend für Immunfluoreszenz (IF)- und Western Blot (WB)-Analysen verwendet, um humane Proteine nachzuweisen. Die Antikörper wurden dazu, bis auf Anti-Human IFN- β , im jeweils angegebenen Verhältnis in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) verdünnt. Einzelne Antikörper wurden je nach Ausgangskonzentration (X, "X"-Form des Produktes, 10-fach konzentriert, siehe Hersteller) in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt (Tab. 3.1). Zusätzlich kamen STAT1 p84/p91 (E-23), STAT2 (H-190), STAT2 (N-17) und ISGF3 γ p48 (H-143) für Chromatinimmunpräzipitationen (ChIP, 3.5.7) zum Einsatz. Der Antikörper Anti-Human IFN- β wurde zur Neutralisierung von endogenem IFN- β verwendet (3.6).

Bezeichnung	Spezifität, Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-Human IFN- β	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen IFN- β , Chemicon (AB1431)	1:400
STAT1 α p91 (C-111)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen STAT1 p91, Santa Cruz (sc-417)	1:200 (WB)
STAT1 p84/p91 (E-23)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen STAT1 (p84 und p91), Santa Cruz (sc-346)	1:500 bzw. 1:2000, X (WB) 1:100 (IF)
Phospho-STAT1 (Tyr701)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Tyrosin701-phosphoryliertes STAT1, Cell Signaling (9171)	1:1000 (WB) 1:100 (IF)
STAT2 (H-190)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen carboxy-terminale STAT2-Domäne (As 662-851), Santa Cruz (sc-346)	1:500 bzw. 1:2000, X (WB) 1:100 (IF)
STAT2 (N-17)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen amino-terminale STAT2-Domäne, Santa Cruz (sc-839)	1:500 (WB)

Fortsetzung nächste Seite.

Bezeichnung	Spezifität, Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-phospho-STAT2 (Tyr689)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Tyrosin689-phosphoryliertes STAT2, Upstate (07-224)	1:1000 (WB)
ISGF3 γ p48 (H-143)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen IRF9, Santa Cruz (sc-10793)	1:2000, X (WB)
ISGF3 γ	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen IRF9, BD Biosciences (610285)	1:250 (WB) 1:100 (IF)
5E10	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen PML, (Stuurmann <i>et al.</i> , 1992)	1:10 (WB) 1:2 (IF)
Anti-Bovine α -Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen α -Tubulin, Molecular Probes (11126)	1:2000 (WB)
GAPDH	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen GAPDH, Abcam (ab9485)	1:2000 (WB)
Histone H2A	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Histon H2A, Abcam (ab18255)	1:200 (WB)
Anti-Green Fluorescent Protein (GFP)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen GFP, Chemicon (MAB3580)	1:500 (IF)
GFP	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen GFP, Abcam (ab6556)	1:2000 (IF)
GFP (FL)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen GFP, Santa Cruz (sc-8334)	1:100 (IF)

Tab. 3.1: Verwendete Primärantikörper gegen zelluläre Proteine. As, Aminosäure.

Folgende Antikörper wurden für den immunologischen Nachweis von viralen Proteinen verwendet und im angegebenen Verhältnis in PBS verdünnt (Tab. 3.2).

Bezeichnung	Spezifität, Bezugsquelle	Verdünnung
1B12	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen 72kDa IE1-Protein (Zhu <i>et al.</i> , 1995)	1:10 (WB) 1:2 (IF)
IE1 Δ N	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen carboxy-terminale IE1-Domäne (As 145-402; Kaps, 2006)	1:200 (IF)
10B4-29	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen pp28 (Silva <i>et al.</i> , 2003)	1:10 (WB)

Tab. 3.2 : Verwendete Primärantikörper gegen virale Proteine. As, Aminosäure.

3.1.2 Sekundärantikörper

Alle verwendeten Sekundärantikörper wurden für Western Blot-Analysen in PBS mit 3% [w/v] Magermilchpulver verdünnt. Für die enzymatische Reaktion der Antikörper-konjugierten Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) wurden die Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Für den Nachweis mit dem Chemilumineszenzsubstrat SuperSignal West Pico (Perbio, Pierce) wurde der jeweilige Antikörper 1:10000 verdünnt und für das sensitivere Substrat SuperSignal West Femto 1: 50000 (Tab. 3.3).

Bezeichnung	Bezugsquelle
HRP Conjugated Affinity Purified Secondary Antibody HRP-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege	Chemicon (AP156P)
Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP-konjugiertes anti-Maus F(ab') ₂ Fragment aus der Ziege	Dianova (115-036-003)

Tab. 3.3: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen.

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden vorwiegend Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper der Firma Invitrogen (Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Das Texas Red-Konjugat von Dianova wurde dagegen 1:100 verdünnt eingesetzt (Tab. 3.4).

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Anti-Maus Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488	Invitrogen (A11001)
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488	Invitrogen (11008)
Alexa Fluor 546 Goat Anti-Kaninchen IgG (H+L) Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den rot-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 546	Invitrogen (A11010)
Alexa Fluor 594 Goat Anti-Kaninchen IgG (H+L) Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den rot-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 594	Invitrogen (A11037)

Fortsetzung nächste Seite.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti-Maus Antikörper aus dem Esel gekoppelt an den rot-fluoreszierenden Rhodamin-Farbstoff Texas Red (H + L)	Dianova (715-075-151)

Tab. 3.4: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Analysen.

3.2 Oligonukleotide und Plasmide

3.2.1 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden in Auftragsarbeit von den Firmen Metabion oder Biomers synthetisiert und durch Hochleistungsflüssigkeitchromatographie gereinigt (Tab. 3.5).

Nr. ¹	Sequenz in 5'→3'-Orientierung	Verwendung
103	GGA GGA AAA AGA GTC CTC TA	Amplifizierung der ISG54 Promotor-Region
104	AGC TGC ACT CTT CAG AAA	
105	GTA TTG GGC GCC TGG TCA G	Amplifizierung der GAPDH cDNA
106	CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG	
109	TCT TCA TGC TCC AGA CGT AC	Amplifizierung der MxA cDNA
110	CCA GCT GTA GGT GTC CTT G	
113	GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG	Amplifizierung der IFN-β cDNA
114	ATG TTC TGG AGC ATC TCA TAG	
121	ACG GTA TGC TTG GAA CGA TTG	Amplifizierung der ISG54 cDNA
122	AAC CCA GAG TGT GGC TGA TG	
145	CGC GGC AAG CTT GGA TCC ACC	Oligonukleotide für Fusions-PCR (Herstellung der IE1-Deletionsmutanten) und zur Generierung von pGEX-IE1
146	ATG GAG TCC TCT GCC	
146	GGC GCG AAG CTT GAA TTC TTA	Sequenzierung der generierten IE1-Deletionsmutanten
149	CTG GTC AGC CTT G	
149	GGT GCG GCA TAG AAT CAA GG	Sequenzierung der generierten IE1-Deletionsmutanten
150	CTA AGA CCA CCA ATG GCT GC	

Fortsetzung nächste Seite.

Nr. ¹	Sequenz in 5'→3'-Orientierung	Verwendung
151	CTC TCC TAG TGT GGA TGA CC	Sequenzierung der generierten IE1-Deletionsmutanten
194	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G	Sequenzierung der generierten IE1-Deletionsmutanten
386	TCCTAGTGTGGATGACCTACGG/ TACACTTTGGCCACCGCTGGTG	Oligonukleotide für Fusions-PCR (Mutagenese IE1Δ373-386)
387	CACCAGCGGTGGCCAAAGTGTA/ CCGTAGGTCATCCACACTAGGA	
388	CACTTTGGCCACCGCTGGTGCC/ GCGACTATCCCTCTGTCCTCAG	Oligonukleotide für Fusions-PCR (Mutagenese IE1Δ395-409)
389	CTGAGGACAGAGGGATAGTCGC/ GGCACCAGCGGTGGCCAAAGTG	
390	TCTGTCCTCAGTAATTGTGGCT/ ACTGTGTCTGTCAAGTCTGAGC	Oligonukleotide für Fusions-PCR (Mutagenese IE1Δ421-445)
391	GCTCAGACTTGACAGACACAGT/ AGCCACAATTACTGAGGACAGA	
392	GGAGGACACTGTGTCTGTCAAG/ GGAGGCAAGAGCACCCACCCTA	Oligonukleotide für Fusions-PCR (Mutagenese IE1Δ451-475)
393	TAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCC/ CTTGACAGACACAGTGTCTCTCC	
394	TCCTAGTGTGGATGACCTACGG/ GAGAACAGTGATCAGGAAGAAA	Oligonukleotide für Fusions-PCR (Mutagenese IE1Δ373-420)
395	TTTCTTCCTGATCACTGTTCTC/ CCGTAGGTCATCCACACTAGGA	
401	TGAGGAAGATGCTATTGTAGCC/ AGCTCCTCTGATTCTCTGGTGT	Oligonukleotide für Fusions-PCR (Mutagenese IE1Δ387-394)
402	ACACCAGAGAATCAGAGGAGCT/ GGCTACAATAGCATCTTCCTCA	

Tab. 3.5: Verwendete Oligonukleotide. ¹ Fortlaufende Nummerierung in der Arbeitsgruppen-Datenbank.

3.2.2 Plasmide

Folgende Vektoren wurden für Transfektionen in Säugerzellen oder für Subklonierungen verwendet (Tab. 3.6).

Nr. ¹	Bezeichnung	Verwendung	Referenz
22	pcDNA3	Expressionsvektor für Säugerzellen	(Invitrogen)
29	pGEX-KG	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine in Bakterien	(Guan & Dixon, 1991)
35	pEGFP-C1	Expressionsvektor für EGFP-Fusionsproteine	(Clontech)
163	pcDNA3-IE1	Expression von HCMV IE1 in Säugerzellen	(Nevels <i>et al.</i> , 2004b)
465	pCMV-p48	Expression von humanem IRF9 in Säugerzellen	(T. Decker, Wien)
473	pEGFP-TN IE1	Expression von EGFP-IE1 (HCMV Towne) in Säugerzellen, Mutagenese	(Meinel, 2006)
477	pcDNA-STAT2-Flag	Expression von humanem STAT2 mit Flag-Epitop in Säugerzellen	(C. Horvarth, Cleveland)
488	pSTAT2-EGFP	Expression von STAT2-EGFP in Säugerzellen	(Banninger & Reich, 2004)
489	pSTAT2 Δ C732-EGFP	Expression von carboxy-terminal (As 732-851) verkürztem STAT2-EGFP in Säugerzellen	(Banninger & Reich, 2004)
533	pcDNA3-HA-N	Expressionsvektor für HA-Fusionsproteine in Säugerzellen	(Stammsammlung, Kaps, 2006)
538	pSTAT2 Δ N235-NLS-EGFP	Expression von aminoterminal (As 1-235) verkürztem STAT2-EGFP mit heterologem NLS (SV40) in Säugerzellen	(Kaps, 2006)

Fortsetzung nächste Seite.

Nr. ¹	Bezeichnung	Verwendung	Referenz
551	pSTAT2ΔC397-EGFP	Expression von carboxy-terminal (As 397-851) verkürztem STAT2-EGFP in Säugerzellen	(Banninger & Reich, 2004)
552	pSTAT2ΔC684-EGFP	Expression von carboxy-terminal (As 684-851) verkürztem STAT2-EGFP in Säugerzellen	(Banninger & Reich, 2004)
553	pSTAT2ΔN112-EGFP	Expression von aminoterminal (As 1-112) verkürztem STAT2-EGFP in Säugerzellen	(Banninger & Reich, 2004)
554	pSTAT2ΔC754-EGFP	Expression von carboxy-terminal (As 754-851) verkürztem STAT2-EGFP in Säugerzellen	(Banninger & Reich, 2004)
575	pEGFP-TN IE1 L174P	Expression von EGFP-IE1 mit L174P-Punktmutation in Säugerzellen	(Meinel, 2006)
576	pEGFP-TN IE1 C279A	Expression von EGFP-IE1 mit C279A-Punktmutation in Säugerzellen	(Meinel, 2006)
577	pEGFP-TN IE1 A373Stop	Expression von carboxy-terminal (As 373-491) verkürztem EGFP-IE1 in Säugerzellen	(Meinel, 2006)
578	pEGFP-TN IE1 E421Stop	Expression von carboxy-terminal (As 421-491) verkürztem EGFP-IE1 in Säugerzellen	(Meinel, 2006)
579	pEGFP-TN IE1 K450R	Expression von EGFP-IE1 mit K450R-Punktmutation in Säugerzellen	(Meinel, 2006)
580	pEGFP-TN IE1 G476Stop	Expression von carboxy-terminal (As 476-491) verkürztem EGFP-IE1 in Säugerzellen	(Meinel, 2006)

Tab. 3.6: Verwendete Plasmide. ¹ Fortlaufende Nummerierung in der Arbeitsgruppen-Datenbank. EGFP, *enhanced green fluorescent protein*, im weiteren Verlauf der Arbeit als GFP bezeichnet. TN, Towne. As, Aminosäure.

3.3 Zellen und Viren

3.3.1 *E. coli*-Stämme

Für Klonierungen und die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme GM169 (dam-) bzw. DH10B verwendet. Die GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe des *E. coli*-Stammes M15pRep4 (Qiagen) generiert (Tab 3.7).

Bezeichnung	Genotyp	Bezug/Referenz
DH10B	<i>E. coli</i> K12 Δ (mrr-hsd RMS-mcrBC) mcrA recA1	Bethesda Research Laboratories, Washington (USA)
GM169	<i>E. coli</i> K12 dam-	R. Wagner, Regensburg
M15[pREP4]	<i>E. coli</i> K12 lac ara gal mtl	R. Wagner, Regensburg/ Villarejo & Zabin, 1974

Tab. 3.7: Verwendete *E. coli* Stämme.

3.3.2 Humane Zelllinien

Zur Durchführung aller Infektionsstudien wurde die für HCMV permissive primäre humane Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 (European Collection of Cell Cultures) verwendet. Zusätzlich wurden MRC-5-Zellen sowohl für *in vivo*- als auch für *in vitro*-Bindungsstudien herangezogen. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden stabil IE1-transduzierte ihf1-Zellen, IE1-negative Kontrollzellen (ihf2) und die Fibrosarkomzelllinie 2fTGH verwendet. Die Transfektion von eukaryotischen Expressionsplasmiden erfolgte sowohl in 2fTGH- als auch in H1299-Zellen. *In vitro*-Bindungsstudien zwischen viralen und zellulären Proteinen erfolgten aus H1299-Zellen sowie 2fTGH-Zellen und deren Abkömmlingen U6A, U3A und U2A (Tab. 3.8).

Bezeichnung	Spezifikation	Referenz
H1299	Humane Lungenkarzinomzelllinie	(Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992)
ihf-2 (ihf2)	Humane immortalisierte Vorhautfibroblasten	(Greaves & Mocarski, 1998)

Fortsetzung nächste Seite.

Bezeichnung	Spezifikation	Referenz
ihf1.3 (ihf1)	IE1-exprimierende, humane immortalisierte Vorhautfibroblasten	(Mocarski <i>et al.</i> , 1996; Greaves & Mocarski, 1998)
MRC-5	Primäre humane embryonale Lungenfibroblasten	(Jacobs, 1966)
2fTGH	Humane Fibrosarkomzelllinie	(Pellegrini <i>et al.</i> , 1989)
U2A	IRF9-negative 2fTGH-Zelllinie	(John <i>et al.</i> , 1991)
U3A	STAT1-negative 2fTGH-Zelllinie	(McKendry <i>et al.</i> , 1991)
U6A	STAT2-negative 2fTGH-Zelllinie	(Leung <i>et al.</i> , 1995)

Tab. 3.8: Verwendete humane Zelllinien.

3.3.3 HCMV-Stämme

Alle verwendeten Virusstämme wurden in der Arbeitsgruppe auf MRC-5- (Wildtyp-HCMV) bzw. ihf1-Zellen (HCMV-CR208) propagiert und bei -80°C gelagert. Als Wildtyp-Virus kam der laboradaptierte Towne-Stamm zu Einsatz. Zusätzlich wurde das IE1-defiziente Virus CR208 verwendet (Tab. 3.9). Die Anzahl infektiöser Partikel in den Präparationen wurde mittels Plaque-Test auf MRC-5-Zellen ermittelt (Enquist & Card, 1996). Die Titer betrugen für Towne $2,2 \times 10^7$ bzw. für Towne-GFP $3,0 \times 10^6$ PFU (*plaque forming units*) pro ml. Der relative Unterschied an HCMV-spezifischer DNA zwischen den verwendeten Virusstocks wurde durch Echtzeit-PCR ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass in der Towne-GFP-Präparation 1,9 mal mehr Genomkopien enthalten waren als in der Präparation von CR208.

Bezeichnung	Spezifikation	Referenz
Towne	HCMV-Wildtyp-Stamm	(Plotkin <i>et al.</i> , 1975)
Towne-GFP	GFP-exprimierender HCMV-Wildtyp-Stamm	(Marchini <i>et al.</i> , 2001)
CR208	Mutante des Towne-Stammes mit Deletion des IE1-spezifischen Exons 4	(Greaves & Mocarski, 1998)

Tab. 3.9: Verwendete Virusstämme.

3.4 Nukleinsäure-Methoden

3.4.1 Isolierung von RNA und reverse Transkription in Einzelstrang-cDNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus $2,5 \times 10^6$ Zellen (MRC-5, ihf1 oder ihf2) erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz von Invitrogen (Bergbauer, 2006). Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen), einschließlich einer DNase-Reaktion zur Eliminierung von DNA-Kontaminationen, nach Herstellerangaben.

Die Konzentration und Reinheit der RNA-Präparationen wurde mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrophotometers (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer) unter Verwendung von Quarzküvetten (Helma) bestimmt (Bergbauer, 2006).

Die Generierung der cDNA erfolgte aus 5 µg gereinigter RNA unter Zuhilfenahme von Oligo(dT)-Primern und der SuperScript III Reversen Transkriptase von Invitrogen. Der Ansatz aus RNA und 50 µM Oligo(dT)-Primern wurde zunächst zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA für 10 min bei 70°C in einem iCycler der Firma BioRad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Abkühlung in Eiswasser, um die Anlagerung der Oligo-dT Startermoleküle an das polyA-Ende der mRNA zu ermöglichen. Nach der Hybridisierung der Startermoleküle wurden jeweils 7 µl Erststrang-Mastermix (5 x First Strand Buffer 4 µl, DTT [0,1 M] 2 µl, dNTP [10 mM] 1 µl, Invitrogen) zugefügt und die Ansätze 2 min bei 42°C vorinkubiert. Anschließend wurde zu jedem der Ansätze 1 µl der retroviralen reversen Transkriptase SuperScript III gegeben und durch Umrühren mit der Pipettenspitze gemischt. Die Synthese der Erststrang-cDNA erfolgte für 60 min bei 42°C. Um das Enzym zu inaktivieren wurde die Temperatur anschließend für 15 min auf 70°C erhöht. Schließlich wurde die zur generierten cDNA komplementäre RNA durch 20-minütige Inkubation bei 37°C mit RNase H (Invitrogen) abgebaut. Die Analyse der gewonnenen cDNA erfolgte standardmäßig durch qualitative PCR und anschließende Agarosegelelektrophorese (Bergbauer, 2006).

3.4.2 Quantifizierung von RNA und DNA durch Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung zellulärer Transkripte wurde die kinetische oder Echtzeit-PCR herangezogen. Die Detektion von akkumulierenden PCR-Produkten in Echtzeit basierte dabei auf der Messung der Fluoreszenz des in Doppelstrang-DNA eingebauten Farbstoffes SYBR-Green I (Roche) am Ende der Elongationsphase. Der Beginn der exponentiellen

Produktzunahme (lineare Log-Phase) der PCR entspricht dem sogenannten *crossing point* (CP-Wert). Dieser korreliert entsprechend folgender Formel mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden DNA und kann deshalb zur Quantifizierung herangezogen werden:

$$N = N_0 \times E^{CP}$$

N: Menge der Moleküle
 N₀: Ausgangsmenge der Moleküle
 E: Amplifikationseffizienz
 CP: Zykluszahl bei Einsetzen der linearen Produktzunahme

Die relativen DNA-Unterschiede zwischen einer Kontrollprobe und der zu bestimmenden Proben wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Verhältnis} = E_Z^{CPZ(K) - CPZ(U)} \times E_R^{CPR(U) - CPR(K)}$$

E: Amplifikationseffizienz
 CP: Zykluszahl bei Einsetzen der linearen Produktzunahme
 Z: Zielgen
 R: Referenzgen (Haushaltsgen)
 K: Kontrollprobe
 U: Unbekannte Probe

Die PCR-Effizienz für die Ziel- und Referenzgene wurde nach Pfaffl (2001) mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Bei einer optimalen Amplifikationseffizienz von 2 verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und damit das Fluoreszenzsignal.

In einem 20 µl-Reaktionsansatz wurden 2 µl einer 1:10 Verdünnung der generierten cDNA zusammen mit 1 µM der jeweiligen Starteroligonukleotid-Paare in eine quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt. Für die Reaktion wurde der SYBR-Green *Mastermix* aus dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit von Roche verwendet, der alle übrigen für die PCR erforderlichen Komponenten enthält. Die Amplifikation wurde in Triplikaten durchgeführt und erfolgte in einem LightCycler-Gerät der Firma Roche wie folgt:

10 s bei 95°C: Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges
 10 s bei xx°C: Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz
 8 s bei 72°C: DNA-Polymerisation (1 s/25 bp)
 (xx: Temperatur abhängig vom jeweiligen Oligonukleotid-Paar)

Nach einmaligem Erhitzen auf 95°C für 10 min, wodurch die Polymerase aktiviert wird, wurde der Zyklus 40-mal durchlaufen. Im Anschluss an die letzte Elongationsphase wurde

zur Spezifitätskontrolle die Schmelztemperatur der generierten PCR-Produkte ermittelt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte nach Angaben des Herstellers (Roche Applied Science Technical Note No. LC 13/2001) unter Verwendung der oben genannten Formeln.

Für ChIP-Experimente wurden dieselben PCR-Bedingungen gewählt, die Hybridisierungstemperatur wurde jedoch im *touchdown*-Modus variiert. Für die Auswertung wurden die relativen Änderungen der koprizipitierten DNA auf die Input-DNA normalisiert und in die weitere Berechnung nach Protokoll des Herstellers eingesetzt. Als Referenz für alle quantitativen PCR-Reaktionen diente das zelluläre Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

3.4.3 Herstellung von internen IE1-Deletionsmutanten

Sämtliche Deletionen wurden durch „Fusions-PCR“-Mutagenese (Ho *et al.*, 1989), ausgehend von 10 ng pEGFP-TN IE1 (Nr. 473, Tab. 3.6), mit Hilfe der Phusion-Polymerase (NEB, Finnzymes) erzeugt. Als äußere Primer wurden jeweils die Oligonukleotide Nr. 145 (a) und 146 (d) (Tab. 3.5) verwendet. Die Einführung der Mutation erfolgte durch die spezifischen Mutagenese-Oligonukleotide Nr. 386-395 (b bzw. c) sowie Nr. 401 (b) und 402 (c) (Tab. 3.5). Zunächst wurden in Schritt 1 die Teilfragmente AB und CD generiert (Abb. 3.1). Hierzu wurde ein 50 µl PCR-Ansatz in einem iCycler (BioRad) für 30 s bei 98°C erhitzt und wie folgt weiter inkubiert:

- 10 s bei 98°C: Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges
- 20 s bei 68°C: Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz; die Temperatur wird bei jedem Schritt um 0,5°C erniedrigt (*touchdown*)
- 8 s bei 72°C: DNA-Polymerisation

Dieser Zyklus wurde 27-mal wiederholt und die 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte durch eine anschließende 10-minütige Inkubation bei 72°C aufgefüllt. In Schritt 2 (Abb. 3.1) erfolgte unter denselben PCR-Bedingungen, jedoch bei gleich bleibender Hybridisierungstemperatur von 65°C und nur für 10 Zyklen, die Vorhybridisierung der Teilfragmente aus Schritt 1 und eine Auffüllreaktion durch die Polymerase. Nach Zugabe der Starteroligonukleotide 145 (a) und 146 (d) (Tab. 3.5) erfolgte die Amplifikation des Fusionsproduktes AD (vgl. PCR-Bedingungen Schritt 1) (Abb. 3.1).

Nach Schritt 1 und 3 erfolgte jeweils eine Reinigung des PCR-Produktes (Qiagen, s. Protokoll des Herstellers) und eine anschließende Analyse durch Agarosegelelektrophorese nach Standardmethode (Bergbauer, 2006).

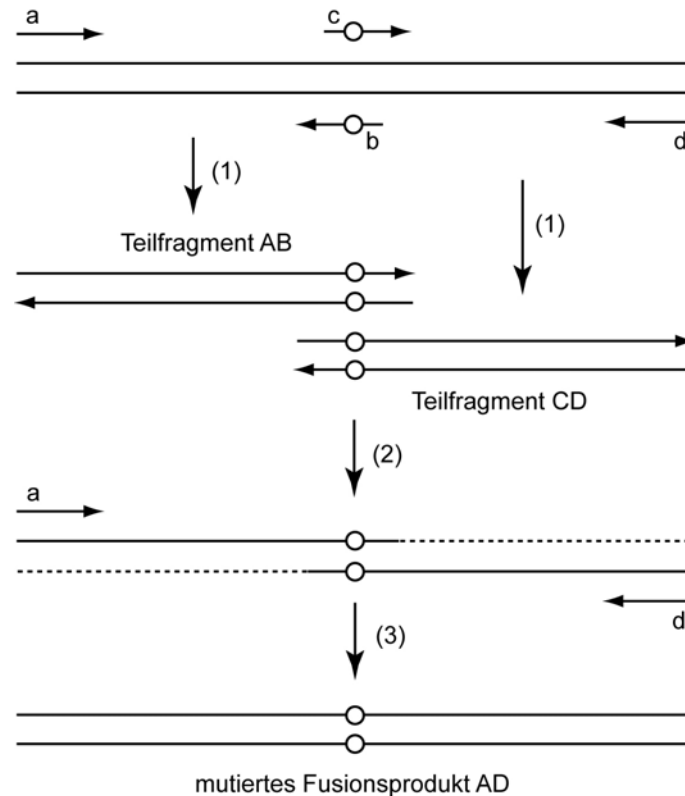


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenese durch Fusions-PCR. Zunächst erfolgt die Herstellung zweier Teilfragmente (AB und CD) in zwei separaten PCR-Ansätzen (1). Jeder Ansatz enthält ein flankierendes Oligonukleotid (a oder d) mit jeweils eingebauter singulärer Schnittstelle. Durch ein internes Oligonukleotid (b oder c), das sich neben der Mutationsstelle anlagert wird über das nicht paarende 5'-Ende die gewünschte Mutation eingeführt. Durch die Verwendung von teilweise komplementären, internen Mutagenese-Oligonukleotiden erhalten die beiden Teilfragmente AB und CD überlappende Enden, über die sie in einer zweiten PCR fusioniert werden können. Nach Denaturierung können die Einzelstränge der Teilfragmente über ihre komplementären Bereiche paaren, so dass es durch die verwendete Polymerase (Phusion) zu einer Strangverlängerung kommt ((2), gestrichelte Linie). Das entstehende Fusionsprodukt kann im Anschluss durch das Oligonukleotidpaar a und d amplifiziert werden (3).

Die erhaltenen Fusionsprodukte wurden mittels T4 Ligase (NEB) mit dem Vektor pEGFP-C1 (Nr. 35, Tab. 3.6) ligiert. Die Ligationsansätze wurden anschließend in kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes GM169 (Tab. 3.7) transformiert. Nach alkalischer Schnelllyse konnten die gewünschten Klone durch Spaltung der gewonnenen Plasmide mit *EcoRI* (NEB) identifiziert werden. Die Mutationen konnten durch DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977), die als Auftragsarbeit von der Firma Geneart durchgeführt wurde, mit den Oligonukleotiden Nr. 149, 150, 151 und 194 (Tab. 3.5) verifiziert werden.

3.5 Protein-Methoden

3.5.1 Expression und Reinigung von Proteinen

Für die Herstellung rekombinanter Proteine wurde der bakterielle Expressionsvektor pGEX-KG (Tab.3.6) verwendet. Zur Generierung eines rekombinanten, IE1-exprimierenden Plasmids wurden MRC-5-Zellen mit Towne-GFP infiziert und nach 24 h die Gesamt-RNA isoliert (3.4.1). Nach reverser Transkription wurde die gewonnene cDNA mit den Oligonukleotiden Nr. 145 und 146 (Tab. 3.5) amplifiziert (PCR, *touchdown*), mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI (NEB) geschnitten und in dieselben Restriktionsschnittstellen von pGEX-KG inseriert. Der Vektor pGEX-KG und das neu hergestellte rekombinante Plasmid pGEX-IE1 wurden im *E.coli*-Stamm M15[pRep4] (Qiagen) produziert. Die Bakterien wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) in Gegenwart von Ampicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) bei 37°C kultiviert. Eine Übernachtskultur des jeweiligen Expressionsklons wurde 1:100 mit frischem Medium verdünnt und bei 30°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von ca. 0,6 inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 0,5 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactosid die Expression des Fremdgens induziert und die Kultur für weitere 16 h bei 25°C geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien aus 1 l Flüssigkultur abzentrifugiert (6000 x g, 15 min, 4°C) und in $\frac{1}{100}$ Kulturvolumen Reinigungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 0,5% [v/v] Triton X-100) resuspendiert. Nach einem Waschschriff mit 40 ml Reinigungspuffer wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Bakteriensediment aus 1 l Flüssigkultur in $\frac{1}{50}$ Volumen eiskaltem Reinigungspuffer mit Proteaseinhibitoren (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) resuspendiert und strikt auf Eis weiterverarbeitet. Die Bakteriensuspension wurde im Anschluss dreimal 2 min mit einer Stabsonde eines Branson Sonifier 450 sonifiziert (*duty cycle*: 70%, *output control*: 5) und unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (27000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand mit den löslichen GST-Fusionsproteinen (GST bzw. GST-IE1) wurde anschließend im *batch*-Verfahren für 45 min bei Raumtemperatur mit der Affinitätsmatrix Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences) inkubiert. Vor Gebrauch wurde die Glutathion Sepharose Matrix in ca. 10 Bettvolumen Reinigungspuffer mit 0,5% [w/v] Magermilchpulver für 30 min bei 4°C äquilibriert und in einem Bettvolumen Reinigungspuffer aufgenommen. Die Affinitätsmatrix mit den

gebundenen Fusionsproteinen wurde abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4°C) und viermal mit einem großen Volumen Reinigungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die mit rekombinantem Protein beladene Glutathion Sepharose in 1 ml Reinigungspuffer aufgenommen und bis zur Verwendung für *in vitro*-Bindungsstudien bei 4°C auf Eis gelagert. Zur Abschätzung der einzusetzenden Proteinmengen wurden die rekombinanten GST-Proteine 1:1 in 2 x Proteinauftragungspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% [w/v] SDS, 0,2% [w/v] Bromphenolblau, 20% [v/v] Glycerin, 0,2 M β -Mercaptoethanol) aufgenommen, für 5 min bei 95°C erhitzt und der Überstand in eine Verdünnungsreihe eingesetzt. Die Verdünnungen wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung (Sambrook *et al.*, 1989) analysiert.

3.5.2 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus humanen Fibroblastenzellen (MRC-5, ihf1, ihf2) wurde die Kulturschale auf Eis gestellt, das Kulturmedium abgesaugt und durch 5 ml eiskaltes Vollmedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellhebers (Costar) von der Kulturschale abgelöst und in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Kulturschale wurde zweimal mit 5 ml eiskaltem Medium gespült, bevor die vereinigte Zellsuspension abzentrifugiert wurde (800 x g, 10 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das „trockene“ Zellpellet sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin, 0,5% [v/v] Triton X-100) mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem; Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2, Sigma) und anschließender Inkubation für mindestens 10 min auf Eis. Nach Sonifizierung (*duty cycle*: 80%, *output control*: 8) wurden unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand nach einer Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) zur Analyse weiterverwendet.

Für Koimmunpräzipitationen wurden MRC-5- und H1299-Zellextrakte wie oben beschrieben hergestellt. Anstatt eines Aufschlusses durch Sonifizierung wurden die Zellen hier jedoch durch sanftes Auf- und Abpipettieren vor und nach einem mindestens 10-minütigen Inkubationsschritt auf Eis lysiert und anschließend zentrifugiert (siehe oben).

Der Überstand wurde erneut zentrifugiert bis kein Pellet mehr sichtbar war und somit alle unlöslichen Bestandteile entfernt waren.

Die transformierten humanen Zelllinien H1299, 2fTGH, U2A, U3A und U6A wurden zur Gesamtzellextrakt-Gewinnung direkt in der auf Eis platzierten 10 cm-Kulturschale zweimal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach Ablösen mit einem Zellheber (Costar) in 5 ml PBS, wurden die Kulturschalen zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gespült. Nach Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) der vereinigten Zellsuspensionen konnte das reine Zellpellet direkt weiterverarbeitet werden.

Für *in vitro*-Bindungsstudien wurden MRC-5-, 2fTGH-, U2A-, U3A- und U6A-Gesamtzellextrakte durch Zugabe von GST-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin, 0,5% [v/v] Triton X-100) mit Proteaseinhibitoren (Calbiochem) aufgeschlossen. Zum Abtrennen der unlöslichen Zellbestandteile wurden die Zellextrakte zentrifugiert (siehe oben) und die Überstände in Bindungsstudien (3.5.5) eingesetzt.

3.5.3 Subzelluläre Fraktionierung

Der Einfluss des HCMV IE1-Proteins auf die subnukleäre Verteilung der Komponenten des ISGF3-Komplexes wurde unter anderem mit der Methode der zellulären Fraktionierung untersucht, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden konnte. Hierzu wurde die humane Lungenkarzinomzelllinie H1299 in 10 cm-Schalen kultiviert und mit der CaPO₄-Methode (Graham & van der Eb, 1973) transfiziert. Nach 48 h wurden die Kulturschalen auf Eis gestellt und die Gesamtzellextrakte, wie unter 3.5.2 beschrieben, hergestellt. Alle Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders vermerkt, eiskalt verwendet. Zellreste, die nach Zentrifugation am Rand der Reaktionsgefäße verblieben waren, wurden durch zusätzliches Spülen mit PBS entfernt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Volumen des Zellsediments abgeschätzt. Die Zellen wurden dann durch Zugabe eines dreifachen Volumens *Cytoskeleton* (CSK)-Puffer (10 mM PIPES, pH 6,8, 300 mM Saccharose, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA; Fey *et al.*, 1984) mit 0,1% [v/v] Triton X-100 mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (Calbiochem, Sigma) aufgeschlossen und für 60 s auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 x g, 5 min, 4°C) konnte der Überstand als Zytoplasma-Fraktion abgenommen werden. Das Zellsediment wurde zweimal mit je 1 ml CSK-Puffer gewaschen und anschließend in einem 1,5-fachen Volumen CSK-Puffer mit 0,5% [v/v] Triton X-100

sowie Protease- und Phosphataseinhibitoren (Calbiochem, Sigma) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (siehe oben) konnte der Überstand als Nukleoplasma-Fraktion abgenommen werden. Das verbliebene Zellsediment wurde wiederum zweimal gewaschen, in einem 1,5-fachen Volumen CSK-Puffer mit DNaseI (100 U/ml, Roche) resuspendiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter DNase-Reaktion wurde zur selben Suspension (NH₄)₂SO₄-Lösung (0,25 M Endkonzentration) zugegeben und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation

(10000 x g, 10 min, 4°C) konnte der Überstand als Chromatin-Fraktion gewonnen werden. Das fibrilläre Sediment, die Fraktion der nukleären Matrix, wurde zweimal mit CSK-Puffer gewaschen und anschließend in einem 1,5-fachen Volumen CSK-Puffer aufgenommen. Alle Proben wurden durch Zugabe von 2 x Proteinauftragspuffer 1:1 verdünnt, 5 min bei 95°C erhitzt und in eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.5.4) eingesetzt oder bei -80°C gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte im Western Blot-Verfahren (3.5.4).

3.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970).

Der Aufbau der Apparaturen, das Gießen der Gele und das Anlegen der Spannung während der Elektrophorese erfolgten entsprechend den Herstellerangaben der Apparaturen (Hoefer SE 600 Ruby, GE Healthcare LifeSciences bzw. Mini-Protean 3 Cell, BioRad). Die Herstellung der Trenn- und Sammelgellösungen und die anschließende Gelelektrophorese in 1 x Tris-Glycin-Puffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 1% [w/v] SDS) erfolgten, wie bereits beschrieben, nach Standardmethoden (Bergbauer, 2006).

Zur immunologischen Detektion wurden die Proteine nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembranen (Optitran BA-S83, Schleicher & Schüll) übertragen. Der Transfer erfolgte in Towbin-Puffer (13 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% [w/v] Methanol) und wurde mit einer Hoefer TE 77 Semidry Transfer Unit (GE Healthcare Life Sciences) oder einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) durchgeführt. Auf der Membran immobilisierte Proteine wurden anschließend zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau S-Lösung (1% [w/v] Ponceau S, 5% [v/v] Essigsäure) reversibel

angefärbt, mit entionisiertem Wasser wieder entfärbt und anschließend mit PBS_{Tween} (PBS, 0.1% [v/v] Tween-20) gewaschen.

Nach Absättigung der freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran (Inkubation in 5% [w/v] Magermilchpulver in PBS) erfolgte die Inkubation mit einer Verdünnung des spezifischen Antikörpers für 2 bis 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach der Bindung des Primärantikörpers und dreimaligem Waschen in PBS_{Tween} erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS mit 3% [w/v] Magermilchpulver (Bergbauer, 2006).

Die Detektion des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers erfolgte nach Chemilumineszenzreaktion durch Schwärzung eines Röntgenfilms. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde das SuperSignal West Pico bzw. SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrat der Firma Pierce verwendet und nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

Um die Intensität der Proteinbanden quantifizieren zu können wurde der gewünschte Röntgenfilm gescannt (72 dpi) und die Banden anschließend mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Scion Image (Version beta 3b, Scion Corporation) densitometrisch quantifiziert.

3.5.5 *In vitro*-Bindungstest

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen IE1 und den drei Komponenten des ISGF3-Komplexes wurden, nach Entnahme eines Aliquots (Input), je ca. 8 µg Glutathion Sepharose-gebundenes GST oder GST-IE1 mit dem Gesamtzelleextrakt (3.5.2) von MRC-5-Zellen einer 15 cm-Kulturschale in GST-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin, 0,5% [v/v] Triton X-100) für 90 min bei 4°C unter Drehen inkubiert. Als Kontrolle wurden die rekombinanten Proteine GST und GST-IE1 zusätzlich nur mit GST-Lysepuffer inkubiert. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min, 4°C) wurde die Sepharose viermal mit ca. 2 ml GST-Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 0,1% [v/v] Triton X-100) gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 2 x Proteinauftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Schließlich wurde die Glutathion Sepharose kurz abzentrifugiert (10000 x g, 30 s, 4°C), der Überstand mit den freigesetzten Proteinen vorsichtig abgenommen und in eine SDS-

PAGE eingesetzt. Eine mögliche Bindung zwischen IE1 und STAT1, STAT2 oder IRF9 wurde durch Western Blot-Analyse untersucht.

Für Bindungsreaktionen mit Extrakten aus 2fTGH-, U2A-, U3A- und U6A-Zellen wurde das oben beschriebene Protokoll leicht modifiziert. Die Konzentrationen der rekombinanten GST-Proteine wurden zunächst mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Außerdem wurden die Molekulargewichte an Hand der jeweiligen Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programmes ExPASy-ProtParam Tool berechnet. Der Faktor zwischen den ermittelten Werten (GST, ca. 25,5 kDa; GST-IE1, ca 82 kDa) wurde zusätzlich in der Berechnung der einzusetzenden Proteinmengen berücksichtigt. Für die Fällungsreaktion wurden 15-18 µg Gluthation Sepharose-gebundenes GST oder GST-IE1 mit dem Gesamtzellextrakt einer 15 cm-Kulturschale inkubiert. Die Hälfte der Ansätze wurde vor der Ernte für 20 min mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt. Die weitere Durchführung des Bindungstests erfolgte wie für MRC-5-Zellen beschrieben.

3.5.6 Koimmunpräzipitation

Ein *in vivo*-Bindungstest zur Untersuchung der Interaktion zwischen IE1 und Komponenten des ISGF3-Komplexes wurde mit Hilfe der Koimmunpräzipitation (KoIP) durchgeführt. Die Gesamtzellextrakte aus infizierten MRC-Zellen in 15 cm-Kulturschalen oder transfizierten H1299-Zellen in 10 cm-Kulturschalen wurden in KoIP-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin, 0,5% [v/v] Triton X-100) mit Proteaseinhibitoren (Calbiochem) resuspendiert. Nach Entnahme eines Aliquots (Input) wurden die Überstände der Gesamtzellextrakte zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes für 1 h bei 4°C mit Protein A Sepharose (Sigma-Aldrich) drehend inkubiert. Nach Zentrifugation (1000 x g, 1 min, 4°C) erfolgte eine Inkubation mit entsprechender Antikörper-gekoppelter (5 µg) Protein A Sepharose oder mit Flag-Agarose (Sigma-Aldrich) für 90 min bei 4°C. Die Protein-beladene Sepharose wurde anschließend viermal mit Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% [v/v] Igepal CA-630) gewaschen, mit 2 x Proteinauftragspuffer versetzt, für 8 min bei 95°C erhitzt und weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Der Nachweis der Bindung erfolgte, nach Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel, durch Western Blot-Analyse.

3.5.7 Chromatinimmunpräzipitation

Die Analyse der DNA-Assoziation von STAT1, STAT2 und IRF9 in An- und Abwesenheit von IE1 erfolgte mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP). Zu Beginn wurden 5×10^6 ihf1- und ihf2-Zellen oder infizierte MRC-5-Zellen durch Zugabe von 1% Formaldehyd zum Kulturüberstand für 10 min bei 37°C fixiert (Quervernetzung von Protein/DNA-Komplexen). Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 M Glycin zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung der Gesamtzellextrakte wie unter 3.5.2 beschrieben. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von ChIP-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,1, 10 mM EDTA, 1% [w/v] SDS, Raumtemperatur) mit Proteaseinhibitor-Tabletten (Complete Mini, Roche) und anschließender Inkubation für mindestens 10 min auf Eis. Im Anschluss wurden die Proben siebenmal je 15 s sonifiziert (konstanter Puls, maximale Energie), um DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 500 kb zu erzeugen. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand 1:10 mit ChIP-Verdünnungspuffer (16,7 mM Tris-HCl, pH 8,1, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 1,1% [v/v] Triton X-100, 0,01% [w/v] SDS) verdünnt. Nach Entnahme eines Aliquots (Input) wurden die Protein/DNA-Komplexe zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes mit einem wässrigen Gemisch aus 50% Lachsspermien-DNA/Protein A Agarose (Sigma-Aldrich) für 30 min bei 4°C drehend inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und zusammen mit Antikörpern gegen STAT1, STAT2 oder IRF9 über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch erneute Zugabe von Lachsspermien-DNA/Protein A Agarose und Inkubation für 1 h bei 4°C erfolgte die Bindung des Antikörper/Protein-Komplexes. Anschließend wurden die pelletierten (1000 x g, 1 min, 4°C) Protein A-Agarose/Antikörper/Protein-Komplexe fünfmal mit vier verschiedenen Waschpuffern in der Reihenfolge Niedrig-Salz-Immun-Komplex-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% [v/v] Triton X-100, 0,1% [w/v] SDS, 1 x), Hoch-Salz-Immun-Komplex-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 0,5 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% [v/v] Triton X-100, 0,1% [w/v] SDS, 1 x), LiCl-Immun-Komplex-Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,1, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% [v/v] Igepal CA-630, 1% [w/v] Natriumdesoxycholat, 1 x) und TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM EDTA, 2 x) gewaschen. Durch Zugabe eines frisch angesetzten Elutionspuffers (1% SDS, 0,1 M NaHCO₃) erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur die Elution des Protein-Komplexes vom Antikörper. Anschließend wurde die Quervernetzung der Protein/DNA-Komplexe durch Zugabe von 5

M NaCl und Inkubation für 4 h bei 65°C wieder aufgehoben. Nach einer Proteinase K (Roche)-Reaktion für 1 h bei 45°C erfolgte die DNA-Isolierung mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung. Von der gewaschenen DNA wurden jeweils 2 µl zur Quantifizierung in eine Echtzeit-PCR (3.4.2) eingesetzt.

3.5.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion von zellulären und viralen Proteinen wurden die Zellen in *6-well*-Platten auf sterilen Deckgläschen kultiviert und mit der CaPO₄-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die bewachsenen Deckgläschen vorsichtig entnommen und dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach oben in neue, bei -20°C vorgekühlte und mit je 2 ml Methanol befüllte, *6-well*-Platten überführt und die Zellen bei -20°C für 15 min fixiert. Nach Absaugen des Methanols und Lufttrocknen konnten die fixierten Zellen bei -20°C gelagert oder sofort für die Immunfärbung verwendet werden.

Der erste Schritt der Immunfärbung erfolgte durch Inkubation mit 2-3 ml Blockierungslösung (2% [w/v] BSA, 0,05% [v/v] Tween-20 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen je einmal mit PBS gewaschen und mit PBS_{Tween} überschichtet. Nach Absaugen des PBS_{Tween} wurde die Fläche um das Deckgläschen herum trocken gewischt und 50 µl einer in PBS verdünnten Primärantikörperlösung vorsichtig aufgetragen. Nach einer Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 h bei 37°C erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min und wiederum eine Benetzung mit PBS_{Tween}. Danach wurden 50 µl einer Sekundärantikörperlösung zusammen mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, Roche) aufgetragen und die Zellen lichtgeschützt, wie oben beschrieben, 1 h bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurden die Deckgläschen vorsichtig entnommen, am Rand trocken getupft und mit Hilfe eines Tropfen ProLong Gold Antifade (Invitrogen) mit der bewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger fixiert und bei Raumtemperatur lichtgeschützt getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Präparate sofort mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (DMRX, Leica) und eines digitalen Bildverarbeitungssystem (MetaView Imaging System) ausgewertet oder bei 4°C gelagert. Die Fotoaufnahmen erfolgten alle bei 500-facher Vergrößerung. Zur Darstellung einzelner Zellkerne wurden die Aufnahmen zusätzlich bearbeitet und einheitlich digital vergrößert.

3.6 Zellkulturverfahren, Transfektionen und Infektionen

Alle Säugerzelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5 mg/ml), Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem befeuchteten HERAcell 240 Inkubator (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

Die relativ langsam wachsenden humanen Fibroblastenzelllinien MRC-5, ihf1 und ihf2 wurden nach Erreichen der Konfluenz (nach ca. einer Woche) im Verhältnis 1:3 subkultiviert (Ausubel *et al.*, 1987). Die transformierten, schnell wachsenden Zelllinien H1299, 2fTGH, U2A, U3A und U6A wurden dagegen nach jeweils 3 bis 4 Tagen im Verhältnis 1:10 auf neue Kulturschalen verteilt.

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden 2×10^5 Zellen am Vortag in 6-well-Platten ausgesät. Die Transfektion erfolgte 24 h später durch CaPO₄-Präzipitation mit 10 µg Plasmid. Die Zellen wurden 48 h *post transfectionem* fixiert. Für subzelluläre Fraktionierungen (3.5.3) oder KoIP (3.5.6) wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät und 24 h später mit insgesamt 15 µg Plasmid transfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte ebenfalls 48 h nach Transfektion.

Für virale Wachstums-Analysen, zur Aktivierung des Jak-STAT-Signalweges oder der Induktion von ISG wurden die Zellen mit 250 oder 1000 U/ml rekombinatem IFN-α (PBL Biomedical Laboratories) behandelt. Dies erfolgte durch Zugabe von IFN-haltigem Medium für die jeweils angegebene Zeit. Bei Infektionen wurden die Zellen für 24 h mit IFN-haltigem Medium vorbehandelt.

Zur Neutralisierung von endogenem IFN-β wurden die Zellen 24 h vor Infektion in Medium mit 500 U/ml eines Antikörpers gegen IFN-β inkubiert. Der Kulturüberstand mit neutralisierendem Antikörper wurde jeden zweiten Tag erneuert und die Behandlung bis zur Ernte der Zellen fortgesetzt.

Die Virusinfektionen mit dem HCMV erfolgten auf wachstumsarretierten MRC-5-Zellen. Hierzu wurde die benötigte Menge Virus bei 37°C aufgetaut, anschließend auf Eis gestellt und 10 mal im Becherresonator des Branson Sonifier 450 beschallt (*duty cycle*: 80%, *output control*: 8). Anschließend wurde die Virussuspension zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4°C) und der virushaltige Überstand für die Infektion verwendet. In 10 cm-Kulturschalen wurden die Zellen zur Adsorption des Virus mit 5 ml

virushaltigem Medium überschichtet und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum abgesaugt und die Zellen bis zur Ernte in 10 ml frischem Vollmedium weiterkultiviert.

Die Bestimmung des Titers einer Virussuspension erfolgte mit Hilfe der 50% *tissue culture infectious dose* (TCID₅₀)-Methode (Dulbecco & Vogt, 1954; Hierholzer & Killington, 1996). Infizierte Zellen konnten aufgrund der GFP-exprimierenden Viren durch Grünfluoreszenz identifiziert werden. Die TCID₅₀ wurde nach der Formel von Spearman und Kaerber (Kaerber, 1931) ermittelt (Knoblach, 2006).

4 Ergebnisse

4.1 Bedeutung von IE1 für die IFN-Resistenz des HCMV

In früheren Arbeiten wurde postuliert, dass ein oder mehrere IE-Genprodukte des HCMV für die Unterdrückung der Typ 1 IFN-Antwort der Zelle verantwortlich sind (Browne *et al.*, 2001). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das abundanteste IE-Protein, IE1-72kDa, dieser antiviralen Antwort entgegenwirken kann. In ersten Experimenten wurden primäre humane Fibroblasten (MRC-5) mit dem HCMV-Wildtyp-Stamm Towne bzw. einer IE1-defizienten Mutante, CR208 (Greaves & Mocarski, 1998), infiziert und die Sensitivität des jeweiligen Virusstammes gegenüber exogen zugesetztem IFN- α bestimmt. Um bereits zu Infektionsbeginn einen einheitlichen antiviralen Status zu erzielen, wurden die Zellen 24 h vor Infektion mit IFN behandelt. Für die Infektion wurde eine hohe Anzahl an infektiösen Viruspartikeln eingesetzt (MOI = 5 PFU pro Zelle), da unter diesen Bedingungen das IE1-defiziente Virus mit wildtypähnlicher Kinetik repliziert (Greaves & Mocarski, 1998). Die Titer der Nachkommenviren wurden anschließend in Triplikaten mit der TCID₅₀-Methode (3.6) quantifiziert. Bereits bei einer IFN-Konzentration von 250 U/ml zeigte die IE1-defiziente Mutante im Vergleich zum Wildtyp ~ 40-fach verminderte Titer. Bei einer IFN-Konzentration von 1000 U/ml wurde das Wachstum von CR208 vollständig inhibiert, wohingegen das Wildtyp-Virus eine zwar abgeschwächte, jedoch immer noch deutliche Vermehrung zeigte (Abb. 4.1).

Durch Infektion von humanen Fibroblasten mit dem HCMV kommt es im Rahmen der angeborenen Immunantwort zur Sekretion von IFN- β . Der Effekt dieses von Fibroblasten endogen produzierten Zytokins auf die Virusreplikation, in An- und Abwesenheit von IE1, sollte durch Zugabe eines IFN- β -neutralisierenden Antiserums genauer untersucht werden. Für diese Wachstumsanalysen wurden im Gegensatz zu den ersten Experimenten geringe Mengen an infektiösen Viruspartikeln eingesetzt (MOI = 0,1 PFU pro Zelle). Unter diesen Bedingungen weist die IE1-defiziente Mutante einen Wachstumsdefekt gegenüber dem Wildtyp-Virus auf (Greaves & Mocarski, 1998). Die Virustiter wurden wiederum mit der TCID₅₀-Methode bestimmt. Auffällig hierbei war, dass der neutralisierende Antikörper keinen Einfluss auf die Virusvermehrung in Wildtyp-infizierten Fibroblasten hatte. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass HCMV-Infektionen unter den gegebenen

Bedingungen nicht durch endogen sezerniertes IFN- β limitiert werden. Erstaunlicherweise konnte durch Zugabe des neutralisierenden Antiserums die Virusausschüttung der Mutante dagegen mehr als 50-fach gesteigert werden (Abb. 4.1).

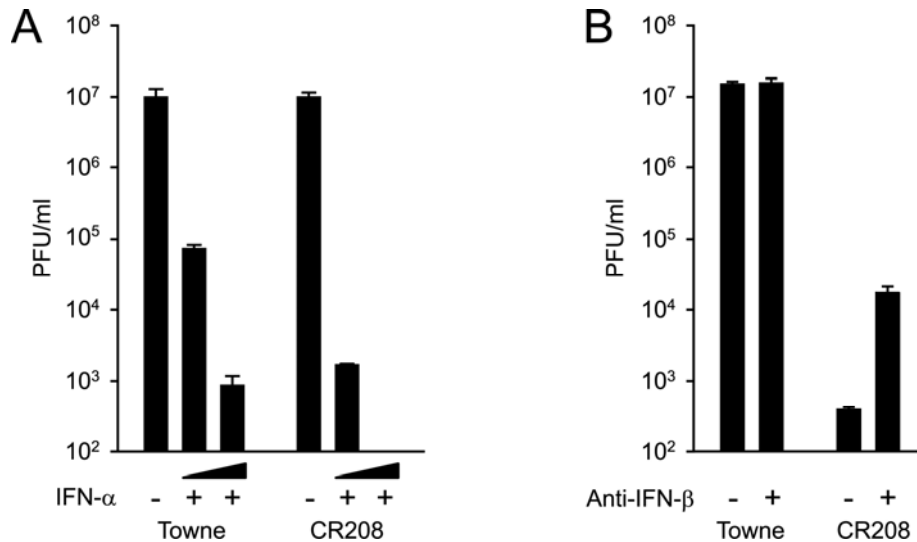


Abb. 4.1: Effekte von exogenem IFN- α bzw. Neutralisation von endogenem IFN- β auf die Ausbeute an Wildtyp (Towne)- und IE1-defizienten (CR208) Nachkommenviren. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. (A) Primäre MRC-5-Zellen, die mit steigenden Mengen (250 bzw. 1000 U/ml) an rekombinatem IFN- α behandelt wurden (+) oder unbehandelte Zellen (-) wurden mit einer MOI von 5 PFU pro Zelle infiziert. Die Zahl der infektiösen Viruspartikel wurde 72 h nach Infektion quantifiziert. (B) MRC-5-Zellen, die mit neutralisierendem IFN- β -spezifischem Antiserum (500 U/ml) behandelt wurden (+) bzw. unbehandelte Zellen (-) wurden mit einer MOI von 0,1 PFU pro Zelle infiziert. Die Zahl der infektiösen Viruspartikel wurde hier nach sieben Tagen ermittelt.

Die vergleichenden Wachstumsanalysen zeigen, dass das HCMV im verwendeten Zellsystem, in Anwesenheit des IE1-Proteins, eine ausgeprägte Resistenz gegenüber virusinduziertem und eine partielle Resistenz gegenüber zusätzlich exogen zugesetztem Typ 1 IFN aufweist. Die IE1-spezifische Virusmutante zeigt dagegen einen IFN-hypersensitiven Phänotyp. Diese ersten Ergebnisse machen damit bereits deutlich, dass dem IE1-Protein eine wichtige Rolle bei der IFN-Resistenz des HCMV zukommt.

4.2 Einfluß des HCMV IE1-Proteins auf die ISG-Induktion

4.2.1 Blockierung der ISG-Induktion durch HCMV IE1 im Infektionsverlauf

Die wichtigste Funktion von Typ 1 IFN während der antiviralen Antwort der Zelle ist die Induktion von ISG. In weiteren Experimenten sollte deshalb untersucht werden, ob IE1 der

ISG-Induktion entgegenwirken kann. Hierzu wurden exemplarisch die mRNAs von ISG54 und MxA, nach Infektion von Fibroblasten (MOI = 1 PFU pro Zelle), durch kinetische Echtzeit-PCR (3.4.2) quantifiziert. Bei ISG54 und MxA handelt es sich um zwei ISRE-kontrollierte Gene, die nach Infektion stark durch Typ 1 IFN induziert werden und somit oftmals als Marker-ISG in (HCMV-)infizierten Zellen verwendet werden.

Die Zugabe von IFN- α (1000 U/ml) bewirkte in nicht infizierten Zellen eine mehr als 40-fache Induktion von ISG54 (Abb. 4.2, A). In den mit Wildtyp-HCMV infizierten Fibroblasten konnte nach 24 h ebenfalls eine deutliche Induktion von ISG54 festgestellt werden. Dieser Effekt wurde durch exogenes IFN- α zusätzlich verstärkt. Sowohl in unbehandelten als auch in IFN-behandelten Zellen, die mit der IE1-defizienten Mutante infiziert wurden, konnte jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine weitaus stärkere Aktivierung des ISG54 Transkriptes nachgewiesen werden (Abb. 4.2, A). Für das MxA-Gen konnten ähnliche Effekte gezeigt werden, wenngleich das MxA-Transkript sowohl durch Infektion als auch durch IFN- α -Behandlung insgesamt deutlich schwächer induziert wurde. Im Gegensatz zu ISG54 und MxA konnten für das IFN- β -Transkript 6 h nach Infektion keine bedeutenden Unterschiede bezüglich der mRNA-Mengen in mit Towne bzw. mit CR208 infizierten Fibroblasten gefunden werden (Abb. 4.2, A, rechte Seite).

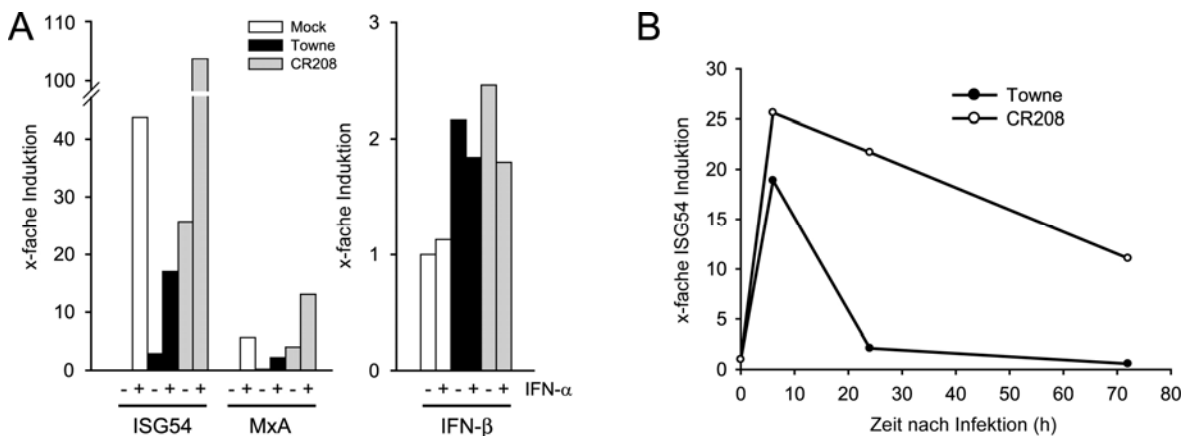


Abb. 4.2: Die Expression von IE1 interferiert mit der Induktion von ISG. (A) MRC-5-Zellen, die mit 1000 U/ml rekombinantem IFN- α behandelt wurden (+) oder unbehandelte Zellen (-) wurden mit einer MOI von 1 PFU pro Zelle mit Towne oder CR208 infiziert. Die mRNAs für ISG54 und MxA wurden 24 h, für IFN- β 6 h nach Infektion durch kinetische Echtzeit-PCR quantifiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (Mock). (B) MRC-5-Zellen wurden mit dem jeweiligen Virus mit einer MOI von 1 PFU pro Zelle infiziert. Die mRNAs wurden 6, 24 und 72 h nach Infektion durch kinetische Echtzeit-PCR quantifiziert.

In weiteren Echtzeit-PCR Studien wurde das ISG54-Transkript zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit Wildtyp bzw. IE1-Mutante analysiert. Hierzu wurden die

mRNAs der infizierten Zellen (MOI = 1 PFU pro Zelle) nach 6, 24 und 72 h isoliert und anschließend quantifiziert. Wie in Abbildung 4.2, B deutlich zu sehen ist, treten 24 h bzw. 72 h nach Infektion signifikante Unterschiede in der Expression von ISG54 zwischen Wildtyp und Mutante auf. Dies konnte jedoch 6 h nach Infektion noch nicht beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde das ISG54-Transkript unabhängig von IE1 stark induziert. Um zu zeigen, dass die initiale Induktion der ISG nach 6 h unabhängig von einer *de novo* Protein-Synthese auftritt, wurde diese in einem weiteren Experiment durch Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) inhibiert. MRC-5-Zellen wurden hierfür unter Zugabe von CHX (100 µg/ml) für 6 h mit dem Wildtyp-Virus Towne bzw. der IE1-defizienten Mutante CR208 infiziert.

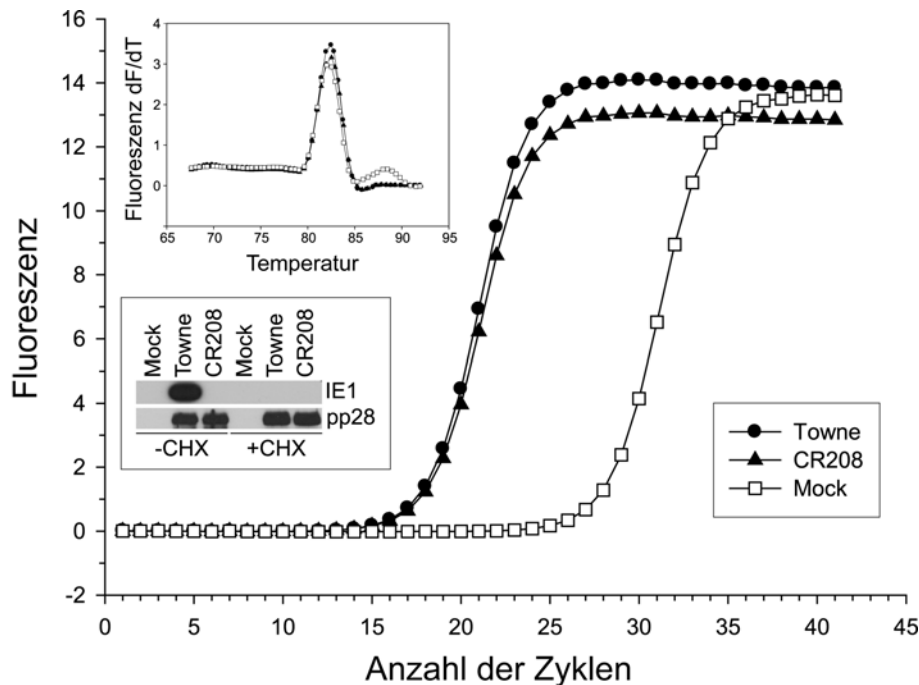


Abb. 4.3: Blockierung der *de novo* Protein-Synthese verursacht vergleichbare ISG54-Induktion bei Infektion mit Towne bzw. CR208. Die Infektion von MRC-5-Zellen erfolgte bei beiden Viren unter Zugabe von 100 µg/ml Cycloheximid (CHX). Die Quantifizierung der ISG54-mRNA erfolgte 6 h nach Infektion durch kinetische Echtzeit-PCR. Dargestellt ist die Zunahme der ISG54-Amplifikate (Fluoreszenz) in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen. Zusätzlich abgebildet sind die spezifischen Schmelzkurven (Verhältnis des Unterschiedes der Fluoreszenz, dF, zum Unterschied der Temperatur, dT, in Abhängigkeit von der Temperatur) der ISG54-Transkripte für Towne und CR208 (oberes Fenster) sowie die Proteinbanden von IE1 und pp28 im Western Blot ohne bzw. mit CHX (unteres Fenster).

Unter diesen Bedingungen konnte im Western Blot, selbst nach längerer Exposition des Films, keine Synthese von IE1 festgestellt werden. Das Phosphoprotein pp28, das mit der Tegumentschicht des Virus in die infizierte Zelle gebracht wird, konnte dagegen in allen Ansätzen nachgewiesen werden (Abb. 4.3, unteres Fenster). Wie im Diagramm der

Echtzeit-PCR gezeigt, wird das ISG54-Gen unter diesen Bedingungen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Mock) bei beiden Viren gleich stark induziert (Abb. 4.3). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die initiale Aktivierung der ISG unabhängig von einer Protein-Neusynthese, und damit auch unabhängig vom IE1-Protein, auftritt. Die zusätzlich abgebildeten Schmelzkurven der ISG54-Transkripte (Abb. 4.3, oberes Fenster) werden bei der kinetischen Echtzeit-PCR zur Kontrolle der Spezifität der jeweiligen PCR-Produkte herangezogen. Nur bei Überlagerung der Kurven, wie hier der Fall, kann von einem identischen PCR-Produkt ausgegangen werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieses Abschnittes, dass das IE1-Protein die infektionsvermittelte Induktion von mindestens zwei ISG deutlich unterdrücken kann. Dabei scheint IE1 keinen entscheidenden Einfluss auf die (IFN-unabhängige) initiale ISG-Induktion zu haben. Die IE1-vermittelte Repression der ISG-Induktion erfolgt vielmehr erst im späteren Verlauf der Infektion.

4.2.2 Blockierung der ISG-Induktion durch HCMV IE1 außerhalb des Viruskontextes

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die ISG-Repression durch IE1 alleine oder unter zusätzlicher Mitwirkung anderer Viruskomponenten verursacht wird. Hierfür wurde die IE1-exprimierende Fibroblasten-Zelllinie ihf1e1 verwendet und die Stärke der Induktion von ISG54 und MxA nach IFN-Behandlung mit einer Kontrollzelllinie (ihf2) verglichen. Wie Abbildung 4.4 zeigt, konnte das virale Protein die Induktion der beiden ISG durch IFN- α effizient unterdrücken.

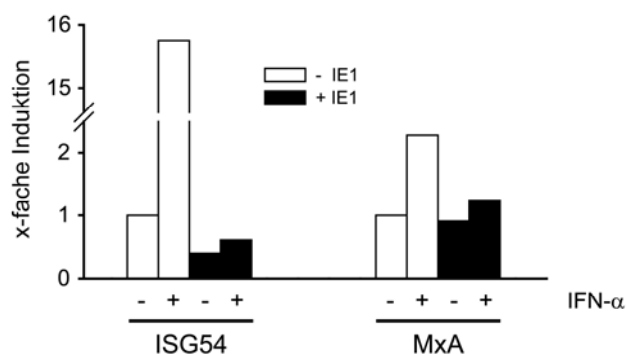


Abb. 4.4: IE1 kann unabhängig von anderen viralen Faktoren der Induktion von ISG entgegenwirken. Die Zelllinien ihf1e1- bzw. ihf2-Zellen wurden für 4 h mit exogenem IFN- α (1000 U/ml) behandelt (+); als Kontrolle wurden unbehandelte (-) Zellen mitgeführt. Anschließend wurden die mRNAs für ISG54 und MxA durch Echtzeit-PCR quantifiziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IE1 auch außerhalb des Viruskontextes, also unabhängig von anderen viralen Faktoren, die IFN-vermittelte ISG-Aktivierung weitgehend verhindern kann.

4.3 Einfluss von IE1 auf die Gleichgewichtsmengen, die Aktivierung und die nukleäre Translokation von Komponenten des ISGF3-Komplexes

4.3.1 IE1 beeinflusst nicht die Expression und Aktivierung der ISGF3-Komponenten

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das HCMV IE1-Protein die infektions- und IFN-vermittelte Aktivierung von einzelnen ISG unterdrücken kann. Die nächste Fragestellung war nun, auf welcher Ebene das virale Protein mit der zellulären IFN-Antwort interagiert. Ein wichtiger Signalweg, der während der Immunantwort durch IFN aktiviert wird und für die Signalübertragung in den Zellkern benötigt wird, ist die Jak-STAT-Signalkaskade. Für die Signalübertragung vom Zytoplasma in den Kern wird ein trimerer Komplex (ISGF3) bestehend aus STAT1 (91 kDa bzw. 84 kDa), STAT2 (113 kDa) und IRF9 (48 kDa) benötigt. Die folgenden Experimente wurden wiederum unter Verwendung der IE1-exprimierenden Fibroblastenzelllinien ihf1 und der Kontrollzelllinie ihf2 durchgeführt.

Zur Bestimmung der Gleichgewichtsmengen der ISGF3-Komponenten STAT1, STAT2 und IRF9 wurden die Zellen für 0, 0,5 und 4 h mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt und die Zelllysate im Western Blot-Verfahren analysiert. Die IE1-Expression wurde ebenfalls überprüft und als Ladekontrolle diente α -Tubulin (Abb. 4.5). Wie an den Proteinbanden in Abbildung 4.5 deutlich zu sehen ist, hat die IE1-Expression keinen nachweisbaren Einfluss auf die Gleichgewichtsmengen von STAT1, STAT2 und IRF9, weder vor noch nach Behandlung der Zellen mit IFN- α . Wie zu erwarten, konnten die beiden aktiven, phosphorylierten Formen von STAT1 und STAT2 (pSTAT1 bzw. pSTAT2) erst nach IFN-Induktion in größeren Mengen nachgewiesen werden. Ein negativer Effekt von IE1 auf den Phosphorylierungsstatus der beiden STAT-Proteine konnte nicht gezeigt werden. In der IE1-exprimierenden Zelllinie ihf1 wurde sogar ein eher gegenteiliger Effekt festgestellt. In diesen Zellen konnten, selbst ohne IFN-Zugabe, reproduzierbar größere Mengen an pSTAT1 und pSTAT2 nachgewiesen werden als in den IE1-negativen Kontrollzellen (ihf2).

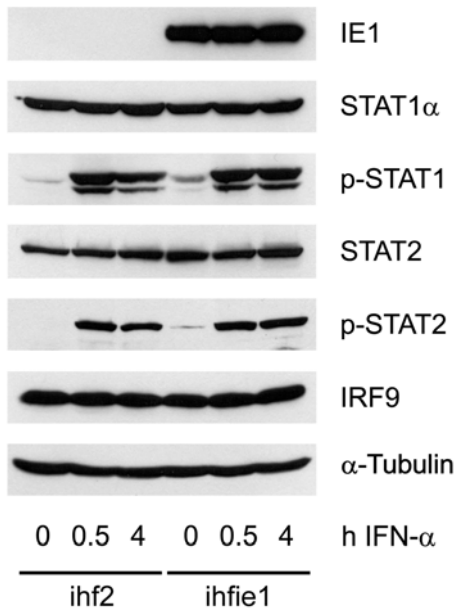


Abb. 4.5: Effekt von IE1 auf die Gleichgewichtsmengen und die IFN-induzierte Phosphorylierung der Komponenten des ISGF3-Komplexes. Zelllysate von IFN- α -behandelten bzw. unbehandelten ihf2- und ihfie1-Zellen wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der einzelnen ISGF3-Komponenten und des viralen IE1-Proteins erfolgte im Western Blot-Verfahren. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. pSTAT1, Tyrosin-phosphoryliertes STAT1; pSTAT2, Tyrosin-phosphoryliertes STAT2.

Eine Blockierung der ISG-Induktion durch negative Regulation der Gleichgewichtsmengen oder der IFN-induzierten Phosphorylierung der ISGF3-Komponenten durch das HCMV IE1-Protein ist damit offenbar ausgeschlossen.

4.3.2 IE1 verhindert nicht die nukleäre Translokation der ISGF3-Komponenten

Als Methode der Wahl zur Untersuchung der zellulären Verteilung von STAT1, STAT2 und IRF9 vor und nach IFN-Behandlung diente die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (3.5.8). Dazu wurden ihf2- und ihfie1-Zellen unbehandelt, oder nach halbstündiger Behandlung mit 1000 U/ml rekombinatem IFN- α fixiert. Nach der Inkubation mit entsprechenden Primärantikörpern wurden die jeweiligen Proteine durch fluoreszierende Sekundärantikörper sichtbar gemacht und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Quantifizierung von 500 Kernen ergab für IE1, im Vergleich zur DAPI-Kernfärbung, in ca. 99% der Zellen ein positives Signal (Abb. 4.6, B). Die Kontrollzellen (ihf2, -IFN- α) zeigten die zelluläre Verteilung von STAT2, pSTAT1 und IRF9 im Grundzustand vor IFN-Behandlung. Inaktives STAT2 lag hierbei vorwiegend im Zytoplasma vor. Eine zytoplasmatische Verteilung zeigte auch STAT1 (hier nicht abgebildet). Die aktive, phosphorylierte Form von STAT1 (pSTAT1) konnte vor IFN-Induktion erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Das IRF9-Protein zeigte dagegen eine ausschließlich nukleäre Verteilung (Abb. 4.6, A). Die subzelluläre Verteilung (nukleär

oder zytoplasmatisch) von IRF9 im nicht-aktivierten Zustand kann Zelltyp-abhängig variieren. Da alle IRF-Proteine ein eigenes, konstitutiv aktives nukleäres Lokalisationssignal (NLS) besitzen, ist die nukleäre Lokalisation in einigen Zelltypen nicht weiter verwunderlich (Lau *et al.*, 2000).

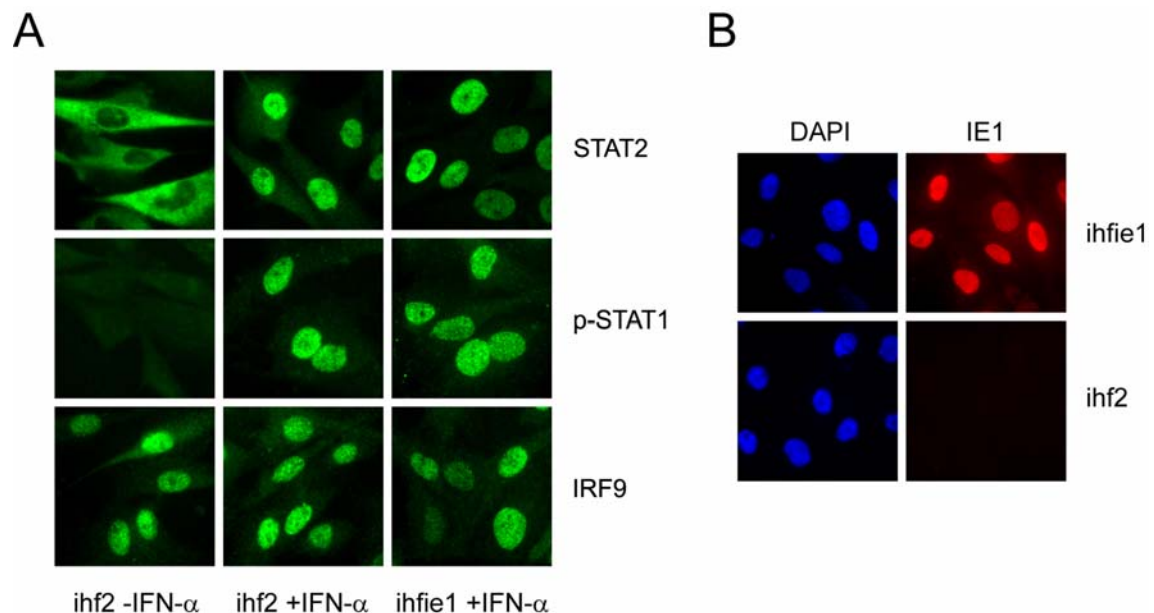


Abb. 4.6: Einfluss von IE1 auf die Lokalisation der Komponenten von ISGF3. (A) Gezeigt ist die Lokalisation von STAT2, pSTAT1 und IRF9 in ihf2- und ihf1e1-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit IFN- α für 30 min. Der Nachweis der zellulären Proteine erfolgte mit Hilfe von polyklonalen Seren gegen STAT2, pSTAT1 und IRF9, gefolgt von einer Inkubation mit einem grün fluoreszierenden Sekundärkonjugat (Alexa Fluor 488). (B) Der Nachweis des viralen Proteins in ihf1e1-Zellen erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen IE1 (1B12), gefolgt von einer Inkubation mit einem rot fluoreszierenden Sekundärkonjugat (Alexa Fluor 546). Die zelluläre DNA wurde zusätzlich mit dem blau fluoreszierenden, DNA-interkalierenden DAPI-Farbstoff angefärbt.

Nach Behandlung mit IFN- α wurde in den ihf2-Zellen die Translokation (hier gezeigt für STAT2) bzw. die Aktivierung (hier gezeigt für pSTAT1) der ISGF3-Komponenten induziert (Abb. 4.6, A, mittlere Reihe). In den IE1-exprimierenden Zellen (ihf1e1) konnte hinsichtlich der Verteilung und Translokation von STAT2, pSTAT1 und IRF9 kein Unterschied zur Kontrolle (ihf2) festgestellt werden.

Zusammen mit den Daten aus Abschnitt 4.3.1 machen diese Ergebnisse deutlich, dass das HCMV IE1-Protein weder die Gleichgewichtsmengen der ISGF3-Komponenten verändert noch ihre Aktivierung durch Tyrosin-Phosphorylierung oder nukleäre Translokation verhindert.

4.4 Intranukleäre Effekte von IE1 auf ISGF3-Komponenten

4.4.1 Einfluss von IE1 auf die subnukleäre Verteilung der ISGF3-Komponenten

Nachdem gezeigt worden war, dass die Aktivierung und anschließende nukleäre Translokation der ISGF3-Komponenten durch IE1 nicht verhindert wird (4.3.1 und 4.3.2), wurde untersucht, inwiefern das virale Protein die subnukleäre Verteilung von STAT1, STAT2 und IRF9 beeinflusst. Hierzu wurden H1299-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3 bzw. pcDNA-IE1 transfiziert und 48 h später einer subzellulären Fraktionierung (3.5.3) unterzogen. Für die Behandlung mit exogenem IFN- α (1000 U/ml) und der anschließenden Zellernte wurden zwei Zeitpunkte gewählt. Zum einen wurde der Effekt von IE1 unmittelbar nach Aktivierung des Jak-STAT-Signalweges untersucht (20 min nach IFN-Behandlung). Zum anderen sollten Langzeiteffekte auf die drei Komponenten des ISGF3-Komplexes nach Abschalten der Signalkaskade (12 h nach IFN-Behandlung) untersucht werden. Zusätzlich wurden außerdem Kontrollansätze ohne IFN mitgeführt. Durch Zellaufschluss mit CSK-Puffer und unterschiedlichen Konzentrationen an Triton X-100 konnten aus den Zellen erfolgreich vier verschiedene Fraktionen gewonnen werden: Zytoplasma(ZP)-Fraktion, Nukleoplasma(NP)-Fraktion, Chromatin(Ch)-Fraktion und nukleäre Matrix (NM). Nach Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose im Western Blot-Verfahren diente eine Ponceau-Färbung als Kontrolle für gleiche Proteinmengen (Abb. 4.7). Der Erfolg der Fraktionierung konnte durch immunologischen Nachweis von GAPDH als ZP/NP-Marker, und durch Histon H2A als Marker für die Ch/NM-Fraktionen bestätigt werden.

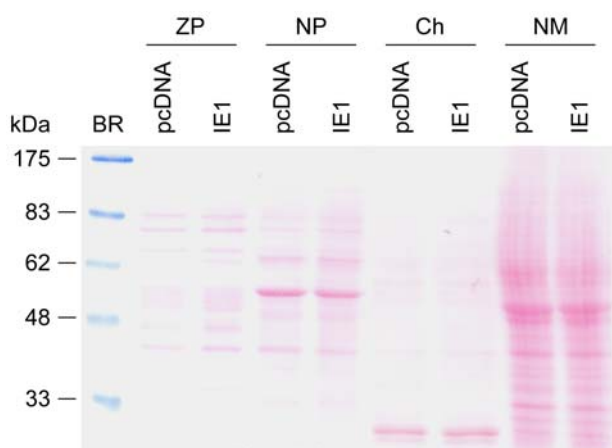


Abb. 4.7: Gesamtproteinmengen der subzellulären Fraktionen. Ponceau-Färbung der im Western Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragenen Zelllysate. BR, *Broad Range* Proteinstandard (NEB). ZP, Zytoplasma; NP, Nukleoplasma; Ch, Chromatin; NM, Nukleäre Matrix.

Das zelluläre Protein GAPDH wurde erwartungsgemäß überwiegend in der ZP-Fraktion angetroffen (Abb. 4.8). Der Nachweis im Nukleoplasma könnte auf stressbedingter nukleärer Translokation von GAPDH beruhen (Dastoor & Dreyer, 2001). Histon H2A wurde hauptsächlich in der Ch-Fraktion nachgewiesen. Geringere Mengen wurden außerdem in der nukleären Matrix detektiert (Abb. 4.8). Das IE1-Protein konnte überraschenderweise in allen Fraktionen nachgewiesen werden, wobei die geringsten Mengen in der Ch-Fraktion gefunden wurden. Der Hauptanteil des viralen Proteins lag jedoch, bei Betrachtung aller drei subnukleären Fraktionen (NP, Ch, NM) und im Einklang mit der Literatur, in der Summe nukleär vor (Abb. 4.8; Castillo & Kowalik, 2002; Nevels *et al.*, 2004a). Für das STAT2-Protein konnte 20 min nach IFN-Behandlung in Anwesenheit von IE1 eine verstärkte Akkumulation in allen Fraktionen nachgewiesen werden (Abb. 4.8, linke Seite). Die STAT1-Mengen stiegen in Anwesenheit des viralen Proteins dagegen weniger deutlich an. Diese beobachtete Akkumulation von STAT1 und STAT2 könnte durch eine Wechselwirkung zwischen dem viralen Protein und den zellulären Proteinen hervorgerufen werden (4.4.3).

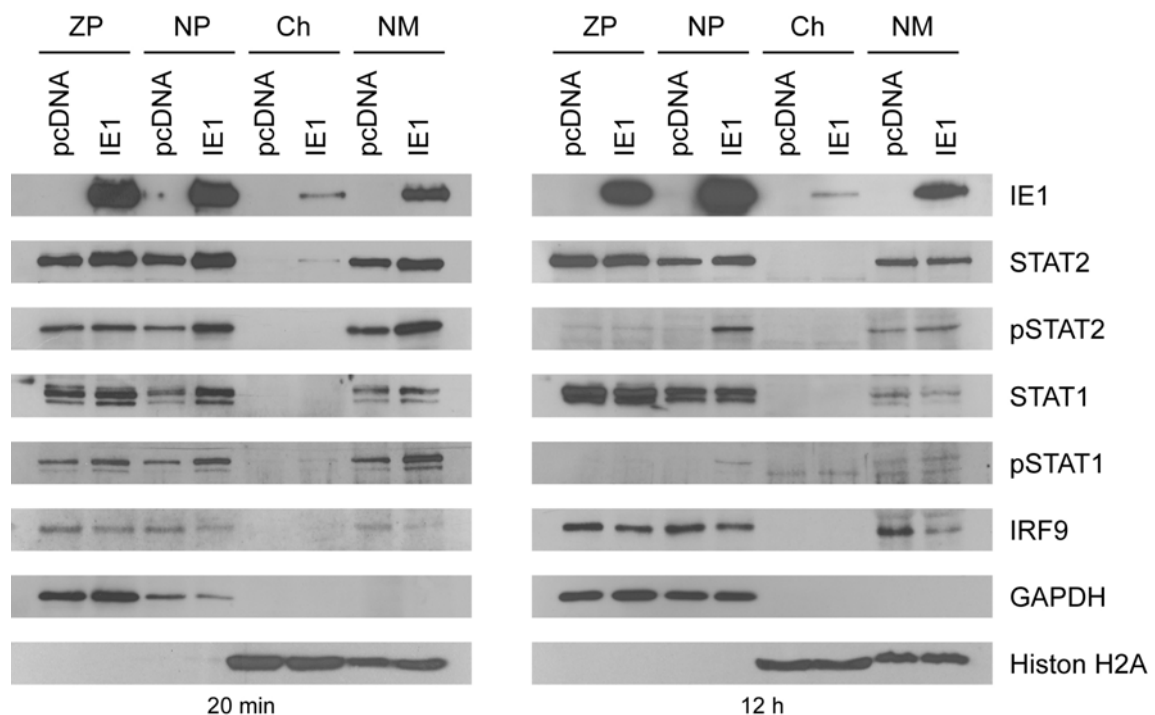


Abb. 4.8: Subzelluläre Verteilung der Komponenten des ISGF3 in Ab- und Anwesenheit von IE1. H1299-Zellen wurden, wie beschrieben, mit pcDNA3 oder pcDNA-IE1 transfiziert und 48 h nach Transfektion für 20 min mit rekombinantem IFN- α (1000 U/ml) behandelt. Die zelluläre Fraktionierung erfolgte direkt im Anschluss (links) bzw. 12 h nach Beginn der IFN-Behandlung (rechts). Die Zelllysate wurden in einem 10%igen (bzw. 15%ig für Histon H2A) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die jeweiligen Proteine anschließend mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens detektiert.

Die Aktivierung der Jak-STAT-Signalkaskade wurde nach 20 minütiger Behandlung mit IFN- α durch die Umverteilung der phosphorylierten STAT-Formen deutlich. Aufgrund der nukleären Translokation, wurde der Hauptanteil von pSTAT1 und pSTAT2 zu diesem Zeitpunkt in der Summe in den drei Kernfraktionen vorgefunden (Abb. 4.8, linke Seite). Auffällig war auch hier eine deutlich stärkere Akkumulation der aktivierten STAT-Formen in den jeweiligen Fraktionen bei Anwesenheit von IE1. Der zusätzliche zytoplasmatische Nachweis phosphorylierter STAT-Formen 20 min nach IFN-Behandlung ist nicht verwunderlich, da die Phosphorylierung im Zytoplasma stattfindet, bevor die heterodimerisierten STAT-Proteine im Anschluss in den Kern translozieren (Darnell, 1997).

Die deutlichsten Effekte konnten für die phosphorylierten Formen der STAT-Proteine (besonders für pSTAT2), 12 h nach IFN-Behandlung beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt liegen die STAT-Proteine wieder größtenteils dephosphoryliert, in ihrer inaktiven Form vor. Im Kontrollansatz (pcDNA) konnte daher kaum noch phosphoryliertes STAT1 und STAT2 nachgewiesen werden. In Anwesenheit von IE1 dagegen war auch 12 h nach IFN-Behandlung noch eine deutliche Akkumulation von pSTAT2 im Nukleoplasma festzustellen. Geringere Mengen konnten zusätzlich in der Matrix-Fraktion detektiert werden (Abb. 4.8, rechte Seite). Für pSTAT1 zeigte sich in Anwesenheit von IE1 ein ähnliches Bild. Die Proteinmengen von pSTAT1 waren insgesamt jedoch deutlich geringer. Die dritte Komponente des ISGF3-Komplexes, IRF9, war 20 min nach Behandlung mit IFN- α nur sehr schwer nachzuweisen. Da es sich bei IRF9 um ein IFN-induzierbares Gen (ISG) handelt, stiegen die Proteinmengen erwartungsgemäß erst später nach IFN-Behandlung an (Abb. 4.8, rechte Seite). Bei näherer Betrachtung der Proteinbanden ist festzustellen, dass vor allem 12 h nach IFN-Behandlung in Anwesenheit von IE1 eine Abnahme der IRF9-Akkumulation auftritt.

Die Tatsache, dass es in keinem Ansatz möglich war größere Mengen der ISGF3-Komponenten in der Chromatin-Fraktion nachzuweisen, lässt vermuten, dass hier nur sehr geringe Mengen an Protein lokalisiert sind oder die hier angewandte Methode der zellulären Fraktionierung für den Nachweis in dieser Fraktion nicht optimal geeignet ist.

Die Ergebnisse der Fraktionierung zeigen jedoch insgesamt einen sehr deutlichen Effekt von IE1 auf die subzelluläre Verteilung vor allem der aktivierten Formen der beiden STAT-Proteine. So wird die phosphorylierte Form von STAT2 offenbar selbst nach Abschalten des Jak-STAT-Signalweges durch das virale Protein effizient im Nukleoplasma

zurückgehalten, was die Reaktivierbarkeit der IFN-Antwort (Phase 2) unterbinden könnte und auf eine Interaktion der beiden Proteine hindeutet.

4.4.2 IE1 verhindert die DNA-Assoziation des ISGF3

Die bisherigen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass IE1 mit einem intranukleären Schritt der Typ 1 IFN-Antwort interferiert und somit die Aktivierung von IFN-abhängigen Genen verhindert. Um diese These zu bestätigen, wurde mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (3.5.7) untersucht, ob die nukleäre Lokalisation von IE1 die sequenzspezifische Assoziation von ISGF3 mit dem ISRE innerhalb der ISG-Promotoren beeinflusst. Nach Behandlung mit 1000 U/ml IFN- α (15, 30 und 60 min) wurden die aufbereiteten Zelllysate von ihf2- bzw. ihf1- Zellen für ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen STAT1, STAT2 oder IRF9 verwendet. In einer anschließenden Echtzeit-PCR (3.4.2) wurde die jeweils kopräzipitierte DNA einer ISRE-umfassenden Region im ISG54-Promotor quantifiziert.

Wie für STAT2 gezeigt, kommt es bei einem Vergleich von unbehandelten und IFN-behandelten ihf2-Zellen bereits nach 15 min zu einem etwa 30-fachen Anstieg in der STAT2-Assoziation mit dem ISG54-Promotor. Dieser Effekt konnte durch längere IFN-Behandlung für 30 bzw. 60 min noch verstärkt werden. Nach 60 min konnte für STAT2 ein etwa 70- bis knapp 100-facher Anstieg der Assoziation am ISG54-Promotor beobachtet werden (Abb. 4.9, A und B). In Gegenwart von IE1 kam es dagegen nur zu einer sehr schwachen Interaktion zwischen STAT2 und dem ISRE. Der Faktor betrug nach 15 min etwa 3 und stieg nach 60 min IFN-Behandlung auf ca. 7 an (Abb. 4.9, A). In ähnlichem Ausmaß konnte nach 60 min auch die Assoziation von STAT1 und IRF9 mit dem ISG54-Promotor durch IE1 unterdrückt werden. Für STAT2 wurden außerdem zusätzlich ChIP-Experimente in infizierten Zellen durchgeführt. MRC-5-Zellen wurden hierfür mit Wildtyp Towne bzw. der IE1-defizienten Virusmutante CR208 infiziert (MOI = 1 PFU pro Zelle) und nach 12 h für die ChIP-Analyse aufbereitet. Passend zu den bisherigen Daten außerhalb des Viruskontextes induzierte die CR208-Mutante eine wesentlich effizientere DNA-Assoziation von STAT2 als das Wildtyp-Virus (Abb. 4.9, C).

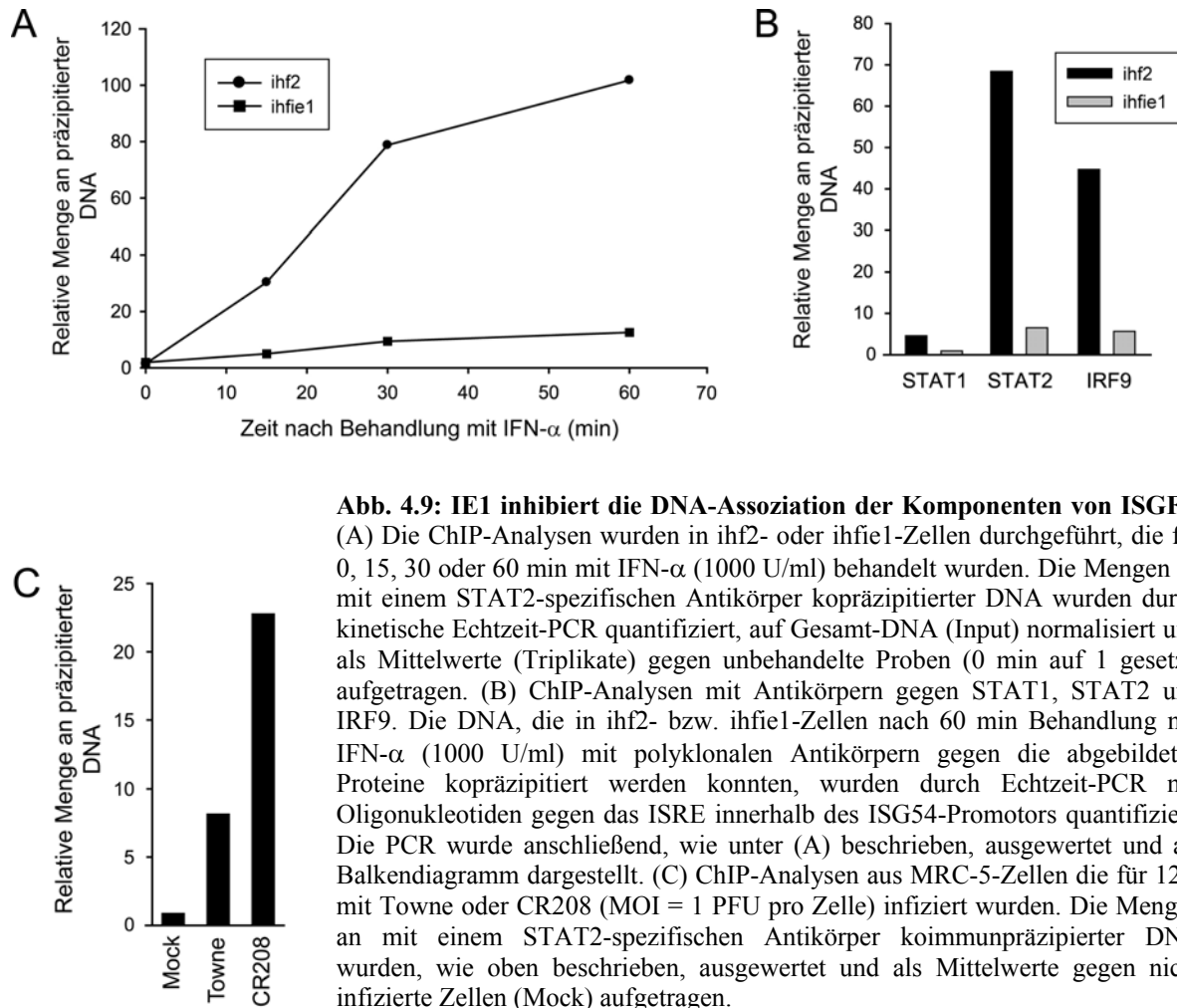


Abb. 4.9: IE1 inhibiert die DNA-Assoziation der Komponenten von ISGF3.

(A) Die ChIP-Analysen wurden in ihf2- oder ihf1e1-Zellen durchgeführt, die für 0, 15, 30 oder 60 min mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt wurden. Die Mengen an mit einem STAT2-spezifischen Antikörper kopräzipitierter DNA wurden durch kinetische Echtzeit-PCR quantifiziert, auf Gesamt-DNA (Input) normalisiert und als Mittelwerte (Triplikate) gegen unbehandelte Proben (0 min auf 1 gesetzt) aufgetragen. (B) ChIP-Analysen mit Antikörpern gegen STAT1, STAT2 und IRF9. Die DNA, die in ihf2- bzw. ihf1e1-Zellen nach 60 min Behandlung mit IFN- α (1000 U/ml) mit polyklonalen Antikörpern gegen die abgebildeten Proteine kopräzipitiert werden konnten, wurden durch Echtzeit-PCR mit Oligonukleotiden gegen das ISRE innerhalb des ISG54-Promotors quantifiziert. Die PCR wurde anschließend, wie unter (A) beschrieben, ausgewertet und als Balkendiagramm dargestellt. (C) ChIP-Analysen aus MRC-5-Zellen die für 12 h mit Towne oder CR208 (MOI = 1 PFU pro Zelle) infiziert wurden. Die Mengen an mit einem STAT2-spezifischen Antikörper koimmunpräzipitierter DNA wurden, wie oben beschrieben, ausgewertet und als Mittelwerte gegen nicht infizierte Zellen (Mock) aufgetragen.

Insgesamt zeigen diese ChIP-Daten, dass mit STAT1, STAT2 und IRF9 alle Komponenten des trimeren ISGF3-Komplexes durch IE1 an der sequenzspezifischen DNA-Interaktion mit dem ISRE gehindert werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der ineffizienten Aktivierung von ISG-Promotoren in HCMV-infizierten und IE1-exprimierenden Zellen (4.2.1 und 4.2.2).

4.4.3 Subnukleäre Kolokalisation und physikalische Wechselwirkung zwischen IE1 und Proteinen des ISGF3-Komplexes

4.4.3.1 Kolokalisation von IE1 mit STAT1, STAT2 und IRF9

Untersuchungen zur möglichen subzellulären Kolokalisation von IE1 mit den drei Komponenten des ISGF3-Komplexes erfolgten durch indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (3.5.8). Die verwendeten Zellen (ihf2 bzw. ihf1e1) wurden für 1 h mit rekombinantem

IFN- α (1000 U/ml) behandelt, fixiert und die jeweiligen Proteine durch Doppelmarkierung detektiert. Die zelluläre Verteilung der Proteine des ISGF3-Komplexes vor und nach IFN-Behandlung ist exemplarisch für STAT2 gezeigt (Abb. 4.10).

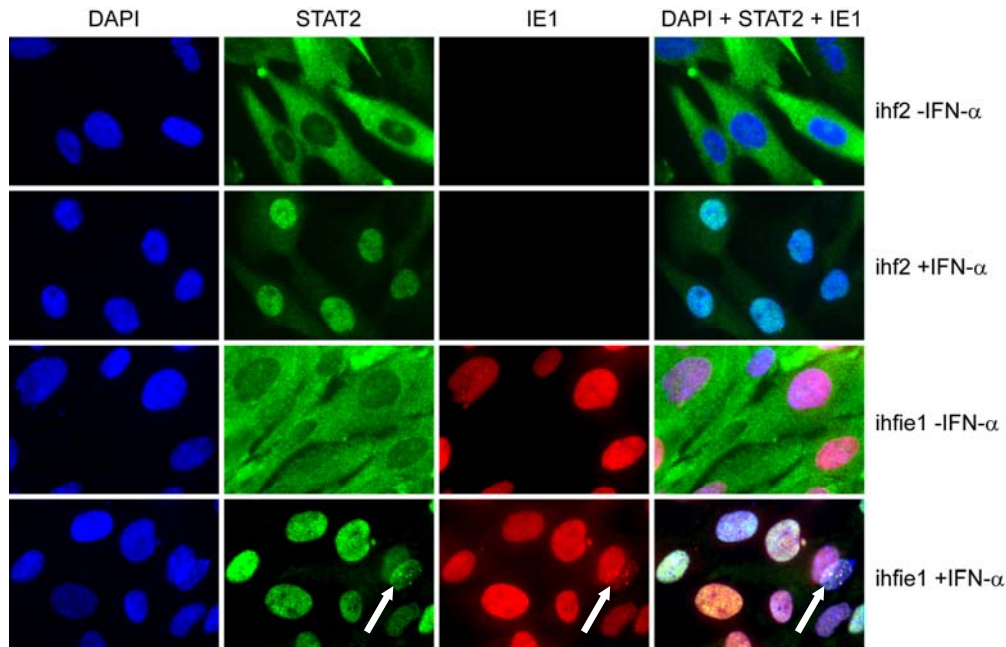


Abb. 4.10: Subzelluläre Verteilung von STAT2. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen die zelluläre Verteilung von STAT2 vor und nach einer einstündigen Behandlung mit IFN- α (1000 U/ml) in ihf2- und ihf1e1-Zellen. Der STAT2-Nachweis erfolgte durch einen polyklonalen Antikörper (H-190) und ein grün fluoreszierendes Sekundärkonjugat (Alexa Fluor 488). Das virale IE1-Protein konnte durch einen monoklonalen Antikörper (1B12) und anschließende Inkubation mit einem rot fluoreszierenden Sekundärkonjugat (Alex Fluor 546) detektiert werden. Zusätzlich dargestellt sind die Kontroll-Färbung der zellulären DNA durch DAPI und eine Überlagerung aller drei Farbfilter. Die weißen Pfeile zeigen auf einen Zellkern mit einer punktförmigen Verteilung von IE1 und STAT2.

Während das IE1-Protein in den meisten Zellen (> 90%) nuklear diffus verteilt war, zeigte es in 5-10% der Zellen eine punktförmige Verteilung im Nukleus (Abb. 4.10, weiße Pfeile; Abb. 4.11, A; Abb. 4.13). In weiteren Immunfluoreszenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass IE1 innerhalb dieser punktförmigen Strukturen mit dem Promyelozytenleukämie (PML)-Protein kolokalisiert, die damit als PML-Körper oder ND10 identifiziert werden konnten (Abb. 4.11, A). Auffällig hierbei war, dass die Zahl der PML-Körper in den IE1-exprimierenden ihf1e1-Zellen wesentlich höher war als in den Kontrollzellen (ihf2). Seit längerem ist bekannt, dass IE1 zu Beginn der Infektion mit den Matrix-assoziierten PML-Körpern assoziiert und diese Multiproteinkomplexe im weiteren Infektionsverlauf auflösen kann (Korioth *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1997). Diese Beobachtung entspricht der diffus nukleären Verteilung von IE1 und PML in > 90% der ihf1e1-Zellen. Eine beginnende Auflösung durch das virale Protein ist höchstwahrscheinlich auch die Ursache für die

höhere Anzahl und geringere Größe dieser Strukturen in den IE1-exprimierenden Zellen mit verbliebenen PML-Körpern (Abb. 4.11). Die IE1-vermittelten Effekte auf PML-Körper konnten zusätzlich in einer zellulären Fraktionierung bestätigt werden. Die Proteinmengen Matrix-assoziiierter PML-Isoformen wurden durch IE1 deutlich reduziert (Abb. 4.12).

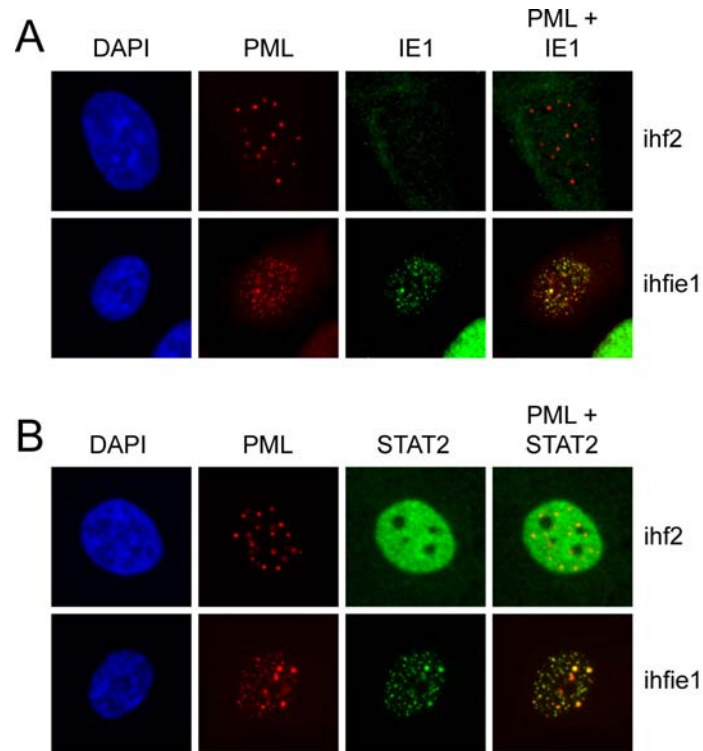


Abb. 4.11: Kolokalisation von IE1 und PML bzw. STAT2 und PML. Die Immunfluoreszenzen zeigen die nukleäre Verteilung von PML und IE1 (A) und von PML und STAT2 (B) nach einer einstündigen IFN-Behandlung in ihf2- und ihfie1-Zellen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen PML und polyklonalen Antikörpern gegen IE1 und STAT2. Als Sekundärantikörper wurden rot fluoreszierende Konjugate gegen Maus (Texas Red) sowie grün fluoreszierende Sekundärkonjugate (Alexa Fluor 488) verwendet. Zusätzlich abgebildet sind die Kontrollfärbung der zellulären DNA mit DAPI und eine Überlagerung der roten und grünen Farbfilter.

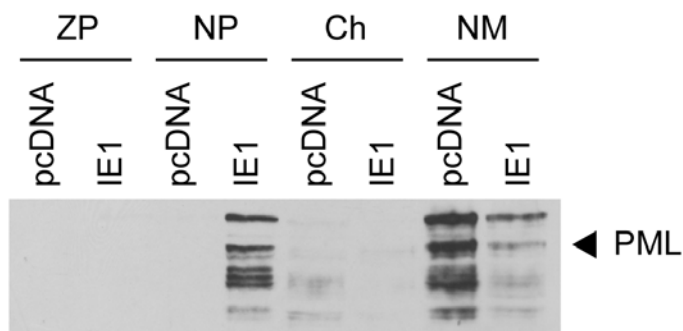


Abb. 4.12: Subzelluläre Verteilung von PML in Abhängigkeit von IE1. Zu sehen sind die verschiedenen Isoformen des PML-Proteins (Pfeil, 69 kDa-Isoform) 4 h nach IFN-Behandlung (1000 U/ml) in An- und Abwesenheit von IE1. Die Zelllysate transfizierter H1299-Zellen wurden einer zellulären Fraktionierung unterzogen, in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das zelluläre PML-Protein durch Western Blot-Analyse detektiert. ZP, Zytoplasma; NP, Nukleoplasma; Ch, Chromatin; NM, nukleäre Matrix.

Für STAT2 konnte an PML-Körpern in > 98% der Zellen eine exakte Überlagerung mit IE1-Signalen beobachtet werden (Abb. 4.11 und 4.13, A). In IE1-negativen Zellen dagegen wies STAT2 auch nach IFN-Behandlung keine punktartige Verteilung auf, sondern zeigte eine ausschließlich diffuse Färbung des Zellkerns (Abb. 4.11, B). In mitotischen Zellen (ca. 1%) konnte eine Assoziation von IE1 mit kondensiertem Chromatin festgestellt werden, wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Lafemina *et al.*, 1989). Interessanterweise konnte in allen untersuchten ihfiel-Zellen eine eindeutige Kolo-kalisation von STAT2 mit IE1 an den Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 4.13, A). In den Kontrollzellen dagegen wurde fast ausnahmslos keine Assoziation von STAT2 mit mitotischem Chromatin gefunden. In einzelnen Fällen assoziierte STAT2 alleine überraschenderweise während der frühen Telophase am Chromatin (nicht gezeigt).

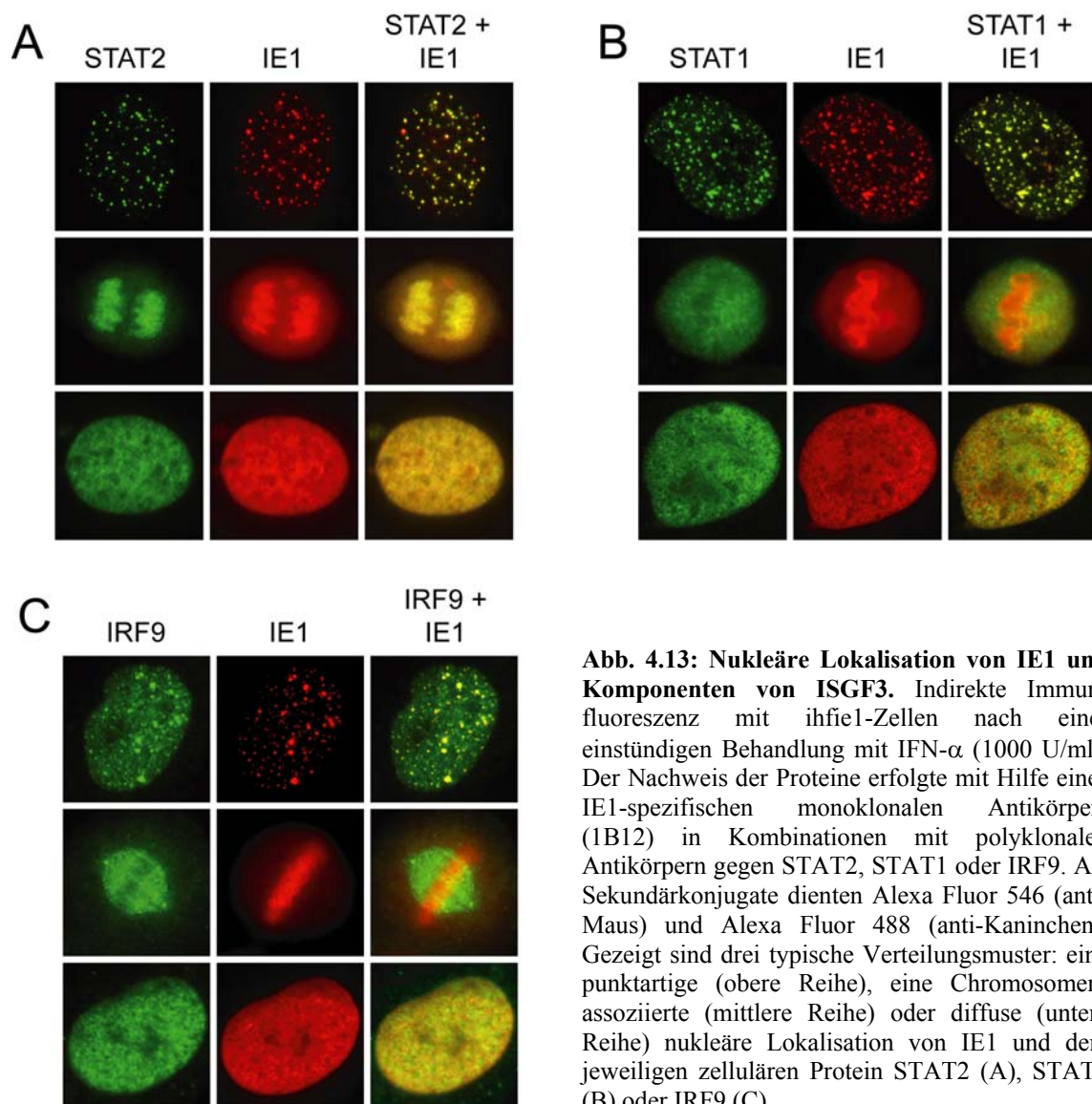


Abb. 4.13: Nukleäre Lokalisation von IE1 und Komponenten von ISGF3. Indirekte Immunfluoreszenz mit ihfiel-Zellen nach einer einstündigen Behandlung mit IFN- α (1000 U/ml). Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe eines IE1-spezifischen monoklonalen Antikörpers (1B12) in Kombinationen mit polyklonalen Antikörpern gegen STAT2, STAT1 oder IRF9. Als Sekundärkonjugate dienten Alexa Fluor 546 (anti-Maus) und Alexa Fluor 488 (anti-Kaninchen). Gezeigt sind drei typische Verteilungsmuster: eine punktartige (obere Reihe), eine Chromosomen-assoziierte (mittlere Reihe) oder diffuse (untere Reihe) nukleäre Lokalisation von IE1 und dem jeweiligen zellulären Protein STAT2 (A), STAT1 (B) oder IRF9 (C).

Für STAT1 konnte keine Kolokalisation mit IE1 an mitotischem Chromatin beobachtet werden, während ein mit STAT2 vergleichbares punktförmiges Verteilungsmuster gefunden wurde. Die Kolokalisation mit IE1 an PML-Körpern war auch hier für den Großteil der untersuchten Kerne (> 90%) gegeben (Abb. 4.13, B). Ähnlich wie im Fall von STAT2, zeigte aber auch STAT1 sowohl in den ihf1- als auch in den ihf2-Zellen größtenteils eine diffuse Verteilung im Nukleoplasma.

Für die dritte Komponente des ISGF3-Komplexes, IRF9, wurde im Vergleich zu STAT1 und STAT2 eine schwächere Assoziation mit der IE1-Lokalisation beobachtet. Nach einer Quantifizierung von 500 Kernen konnte in nur etwa 67% der Fälle eine Kolokalisation von IRF9 und IE1 an PML-Körpern festgestellt werden. Auch für IRF9 wurde keine Kolokalisation mit IE1 an kondensiertem Chromatin gefunden, vielmehr zeigte das Protein häufig eine Assoziation mit dem Spindelapparat mitotischer Zellen (Abb. 4.13, C). In ihf1-Zellen mit diffuser Verteilung von IE1 im Nukleoplasma oder IE1-negativen Zellen zeigte auch IRF9, vergleichbar mit STAT1 und STAT2, ein diffuses Verteilungsmuster.

Die intranukleäre Kolokalisation von IE1 mit den drei Proteinen des ISGF3-Komplexes deutet auf eine physikalische Wechselwirkung des viralen Proteins mit dem gesamten Komplex und/oder einzelnen Komponenten hin. Dieser Vermutung wird im nächsten Abschnitt (4.4.3.2) nachgegangen.

4.4.3.2 Physikalische Interaktion zwischen IE1 und STAT1/STAT2

Die Ergebnisse der Kolokalisationsstudien zwischen IE1 und den drei Komponenten des ISGF3-Komplexes lassen vermuten, dass das virale Protein möglicherweise in einem physikalischen Komplex mit STAT1, STAT2 und/oder IRF9 vorliegt. Zur Klärung dieser Annahme wurden *in vivo* Bindungsstudien mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen (3.5.6) durchgeführt. MRC-5-Zellen wurden mit Wildtyp-HCMV (Towne) oder der CR208-Mutante bei einer MOI von 3 PFU pro Zelle infiziert und nach 24 h für die Immunpräzipitation mit einem IE1-spezifischen Antikörper verwendet. Nach Western Blot-Transfer wurde mit entsprechenden Antikörpern eine mögliche Koimmunpräzipitation von IE1 mit STAT1, STAT2 oder IRF9 untersucht.

Wie zu erwarten, konnte das IE1-Protein nur in den mit Wildtyp infizierten Zellen nachgewiesen werden. Während sich die Gleichgewichtsmengen an STAT1- und IRF9-Protein durch die Virusinfektion nicht sichtbar veränderten wurde eine verstärkte STAT2-

Akkumulation in infizierten gegenüber nicht-infizierten Zellen beobachtet (Abb. 4.14). Wie in Abbildung 4.14 (rechts) zu sehen ist, konnte nach Immunpräzipitation eine deutliche Wechselwirkung zwischen IE1 und STAT2 festgestellt werden. Es konnten außerdem Banden der STAT1-Isoformen p91 und p84 (s. auch Abb. 4.15, A) detektiert werden. Die Interaktion von IE1 mit STAT1 schien im Vergleich zu STAT2 aber sehr viel schwächer zu sein, da erst nach längerer Exposition des Films ein STAT1-Signal sichtbar wurde. Auch nach mehreren Versuchen war es nicht möglich eine Interaktion zwischen IE1 und IRF9 nachzuweisen. Um unspezifische Bindungen der einzelnen Proteine auszuschließen, wurden bei allen Experimenten jeweils Ansätze ohne IE1-Antigen (CR208) bzw. ohne Antikörper (nur Sepharose-Matrix) mitgeführt.

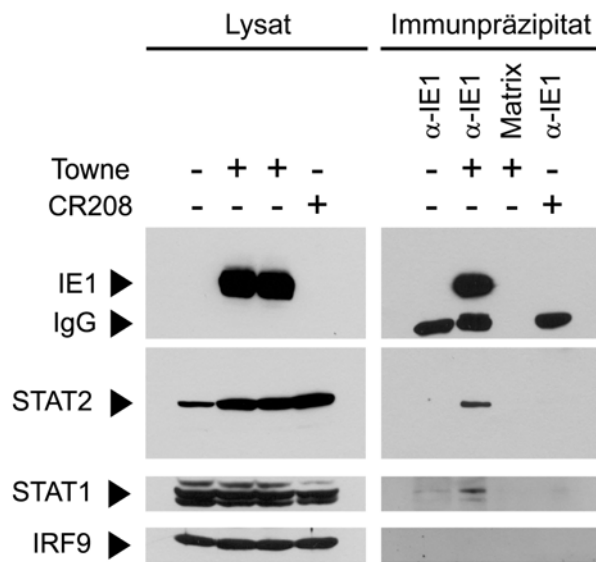


Abb. 4.14: Physikalische Interaktion zwischen IE1 und Proteinen des ISGF3-Komplexes *in vivo*. MRC-5-Zellen wurden bei einer MOI von 3 PFU pro Zelle mit Towne oder CR208 für 24 h infiziert oder uninfiziert verwendet. Die anschließende Immunpräzipitation wurde mit einem IE1-spezifischen Antikörper (1B12) oder Antikörper-freier Sepharose (Matrix) durchgeführt. Die Proteine des Gesamtzellextraktes (ca. 5% des Lysats) dienten als Input; links) und die Immunpräzipitate (rechts) wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Western Blot-Analyse mit den abgebildeten Antikörpern detektiert. IgG, Immunglobulin G (schwere Ketten).

Zur Bestätigung der erhaltenen *in vivo* Daten wurde die Interaktion zwischen IE1 und den Komponenten des ISGF3-Komplexes nochmals *in vitro* in einer Fällungsreaktion mit GST (*GST capture assay*, 3.5.5) untersucht. Für die Reaktion wurden MRC-5-Zellextrakte mit gleichen Mengen an rekombinantem, in *E.coli* exprimiertem GST-IE1-Fusionsprotein bzw. mit GST alleine inkubiert. Die einzusetzenden Proteinmengen von GST und GST-IE1 wurden zuvor in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Analyse unterschiedlicher Verdünnungen und Coomassie-Färbung abgeschätzt (Abb. 4.15, B). Durch anschließende Western Blot-Analyse konnten die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Auch hier zeigte sich eine starke Interaktion zwischen STAT2 und IE1. Die sehr viel schwächere STAT1-Bindung konnte wiederum erst nach längerer Exposition nachgewiesen werden (Abb. 4.15, A). Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen IE1 und IRF9 ergab erneut keine Anzeichen für eine Bindung dieser beiden Proteine.

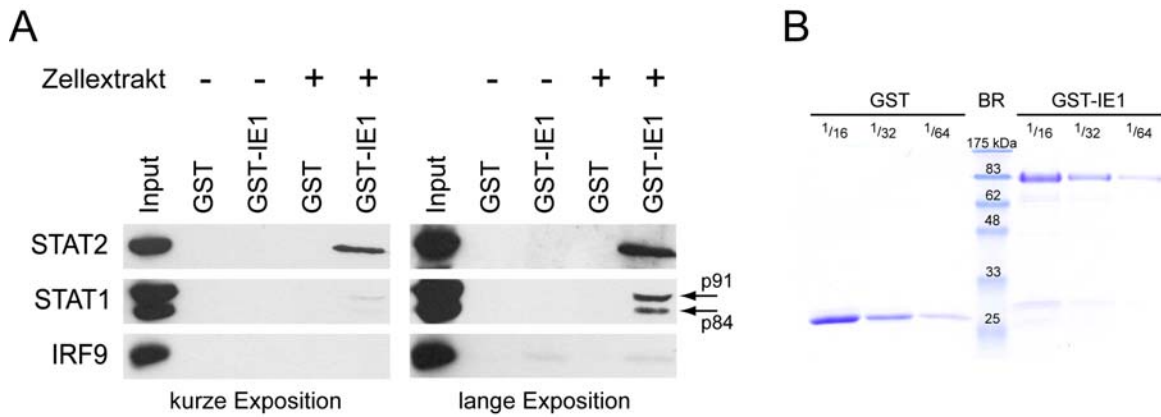


Abb. 4.15: Physikalische Interaktion zwischen IE1 und Proteinen des ISGF3-Komplexes *in vitro*. (A) Für GST-Fällungsreaktionen wurden gleiche Mengen an GST und GST-IE1 mit Gesamtzellextrakten von MRC-5-Zellen (+) oder mit GST-Lysepuffer (-) inkubiert. Die Komplexe bzw. Gesamtzellextrakte (Input) wurden anschließend in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion von STAT1, STAT2 und IRF9 erfolgte durch Western Blot-Analyse. Es sind zwei verschiedene Filmexpositionen abgebildet. Die Pfeile zeigen auf die zwei STAT1-Isoformen p91 und p84. (B) Coomassie-Färbung der in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten rekombinanten Proteine GST und GST-IE1. Zum Abgleich der Proteinmengen wurden jeweils drei unterschiedliche Verdünnungen aufgetragen. BR, *Broad Range* Marker (NEB).

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass das HCMV IE1-Protein nicht nur funktionell sondern auch physikalisch mit zwei Komponenten (STAT1 und STAT2) des ISGF3-Komplexes interagiert. Die IE1-STAT-Wechselwirkungen sind dabei unabhängig von weiteren viralen Faktoren. Bei der Interaktion zwischen IE1 und STAT2 scheint es sich, im Vergleich zu STAT1, um eine hochaffine und damit vermutlich direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zu handeln.

4.4.3.3 Wechselseitige Abhängigkeit der IE1-STAT-Interaktionen

Wie aus den bisherigen Ergebnissen hervorgeht, unterscheiden sich STAT1 und STAT2 deutlich in ihrer Bindungseffizienz gegenüber IE1. Aufgrund der Heterodimerisierung der beiden ISGF3-Komponenten nach IFN-Induktion wäre es daher denkbar, dass die Bindung zwischen IE1 und STAT1 indirekt über die Wechselwirkung mit STAT2 erfolgt, während es sich bei der Interaktion mit STAT2 um eine STAT1-unabhängige, direkte Protein-Protein-Wechselwirkung handeln könnte.

GST-Fällungsreaktionen mit STAT2-, STAT1- und IRF9-negativen Zellen sollten diese These klären. Zur Untersuchung der Bindung wurden wiederum gleiche Mengen an rekombinantem GST- und GST-IE1-Protein (4.16, B) mit Gesamtzellextrakten von parental 2fTGH-Zellen, U6A-Zellen (STAT2-negativ), U3A-Zellen (STAT1-negativ)

und U2A-Zellen (IRF9-negativ) inkubiert (Abb. 4.16, B). Durch Western Blot-Analyse konnte in den Wildtyp-Zellen (2fTGH) eine zu MRC-5-Zellen vergleichbare Bindungseffizienz zwischen GST-IE1 und STAT2 (hocheffizient) bzw. STAT1 (weniger effizient) erzielt werden. STAT1-negative Zellen zeigten im Vergleich zu den Parentalzellen eine eindeutig nachweisbare, wenn auch schwächere Bindung zwischen IE1 und STAT2. Im Gegensatz dazu konnte in den STAT2-negativen Zellen keine Bindung von IE1 an STAT1 nachgewiesen werden (Abb. 4.16, A).

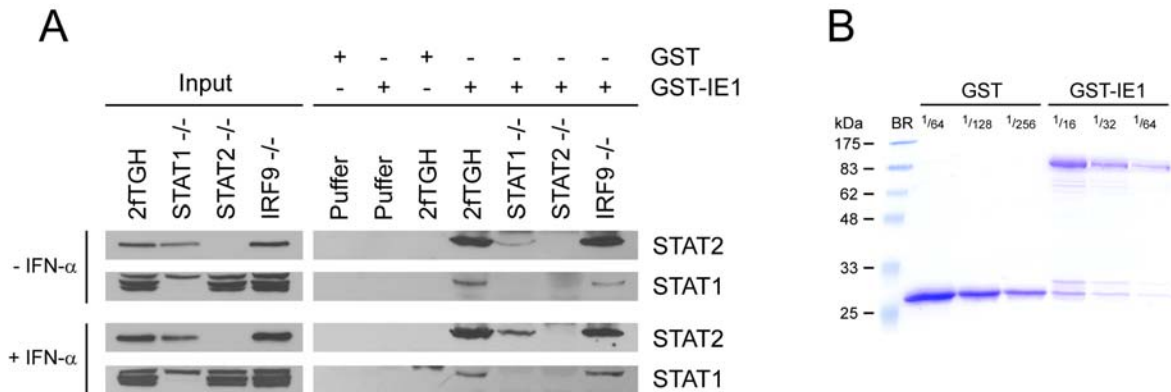


Abb. 4.16: Wechselseitige Abhängigkeit der IE1-STAT1- und IE1-STAT2-Interaktion von den jeweils anderen ISGF3-Komponenten. (A) Für GST-Fällungsreaktionen wurden gleiche Mengen an GST und GST-IE1 mit Gesamtzellextrakten von 2fTGH-, U6A- (STAT2 -/-), U3A- (STAT1 -/-) oder U2A- (IRF9 -/-) Zellen (+) oder mit GST-Lysepuffer (-) inkubiert und die Komplexe bzw. Gesamtzellextrakte (Input) in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion von STAT1, STAT2 erfolgte durch Western Blot-Analyse. In zwei verschiedenen Versuchsansätzen wurde die Komplexbildung in unbehandelten Zellen (oben) oder in für 20 min mit IFN-α behandelten (1000 U/ml) Zellen (unten) untersucht. (B) Coomassie-Färbung der in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten rekombinanten Proteine GST und GST-IE1. Zum Abgleich der Proteinmengen wurden drei unterschiedliche Verdünnungen aufgetragen. BR, *Broad Range* Marker (NEB).

In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen zusätzlich für 20 min mit IFN-α (1000 U/ml) behandelt. Auch in diesem Fall konnte in Abwesenheit von STAT2 für STAT1 keine spezifische Bindung an IE1 gezeigt werden. Auffällig war hierbei, dass die IFN-α-Behandlung die Wechselwirkung zwischen STAT2 und IE1 in den STAT1-negativen Zellen offenbar stabilisieren konnte, trotz gleich bleibender STAT2-Mengen in den Wildtyp-Zellen (Abb. 4.16, A, unten).

Das Fehlen von IRF9 in den U2A-Zellen schien keinen Effekt auf die Interaktion von IE1 mit den beiden STAT-Proteinen zu haben (Abb. 4.16, A). Allerdings waren die endogenen IRF9-Mengen selbst in den Wildtyp-Zellen zu gering um das Protein im Western Blot-Verfahren nachweisen zu können. Daher wurde IRF9 in einem weiteren Experiment in H1299-Zellen überexprimiert. Diese ISGF3-Komponente konnte jedoch trotz hoher

zellulärer IRF9-Mengen nicht durch GST-IE1 gefällt werden, wohingegen STAT2 in beiden Ansätzen (-/+ IFN- α) mit IE1 interagiert (Abb. 4.17).

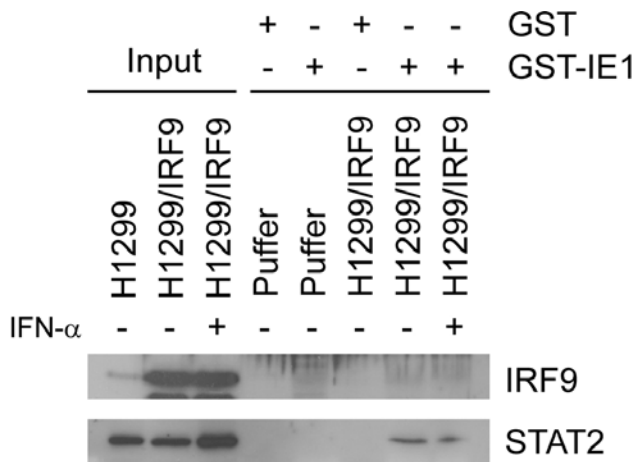


Abb. 4.17: Überexpression von IRF9. Für GST-Fällungsreaktionen wurde IRF9 nach Plasmid-Transfektion in H1299-Zellen überexprimiert. H1299-Zellen oder IRF9-überexprimierende H1299-Zellen wurden unbehandelt (-), oder für 20 min mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt (+), lysiert und mit gleichen Mengen an GST oder GST-IE1 inkubiert. Die Auftrennung der Komplexe oder der Gesamtzelllysate (Input) erfolgte in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel und die anschließende Detektion durch Western Blot-Analyse mit polyklonalen Antikörpern gegen IRF9 und STAT2.

Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass es sich bei der Wechselwirkung zwischen STAT2 und IE1 höchstwahrscheinlich um eine direkte physikalische Interaktion handelt, die jedoch durch das STAT1-Protein stabilisiert werden kann. STAT1 kann dagegen offenbar nur indirekt, über die Heterodimerisierung mit STAT2, an das virale Protein binden. Dagegen ist die dritte ISGF3-Komponente, IRF9, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 4.4.3.2, entweder nicht Teil eines IE1-(STAT1)-STAT2-Komplexes oder eine möglicherweise sehr schwache (indirekte) Interaktion ist unter den verwendeten Bedingungen nicht detektierbar.

4.5 Bestimmung der Interaktionsdomänen im IE1- und STAT2-Protein

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass das HCMV IE1-Protein, durch das Eingreifen in die Jak-STAT-Signalkaskade und die daraus resultierende Unterdrückung der ISG-Induktion einen entscheidenden antiviralen Mechanismus der humanen Wirtszelle umgehen kann. Dieses Ziel erreicht das Virus offenbar in erster Linie durch die physikalische und funktionelle Interaktion des IE1-Proteins mit einem kritischen zellulären Mediator der IFN-Antwort, STAT2. Um noch detailliertere Hinweise auf die Voraussetzungen und Konsequenzen dieser Wechselwirkung zu erhalten, sollten jeweils die interagierenden Bereiche im IE1- und STAT2-Protein eingegrenzt werden.

Das HCMV IE1-Protein gilt als universeller Transaktivator der Genexpression, kann posttranslational modifiziert werden und besitzt zudem Aminosäurereste die eine

Assoziation mit zellulärem Chromatin ermöglichen. Für die folgenden Analysen wurde der carboxyterminale Abschnitt des viralen Proteins gewählt, da sich hier mehrere Aktivator-Domänen (*acidic domains*, AD; saure Domänen mit Ansammlungen an Glutamin- und Asparaginsäure; Serin-/Prolin-reiche Domäne, S/P), das Chromatinbindemotiv (*chromatin tethering domain*, CTD) sowie die Bereiche für die Phosphorylierung und SUMOylierung befinden. Insofern handelt es sich hierbei um Regionen, die die regulatorischen Eigenschaften von IE1 stark beeinflussen. Abbildung 4.18 (oben) zeigt das 72kDa Volllängen-Protein des HCMV Towne-Stammes mit den wichtigsten strukturellen und funktionellen Domänen und Motiven im carboxyterminalen Bereich.

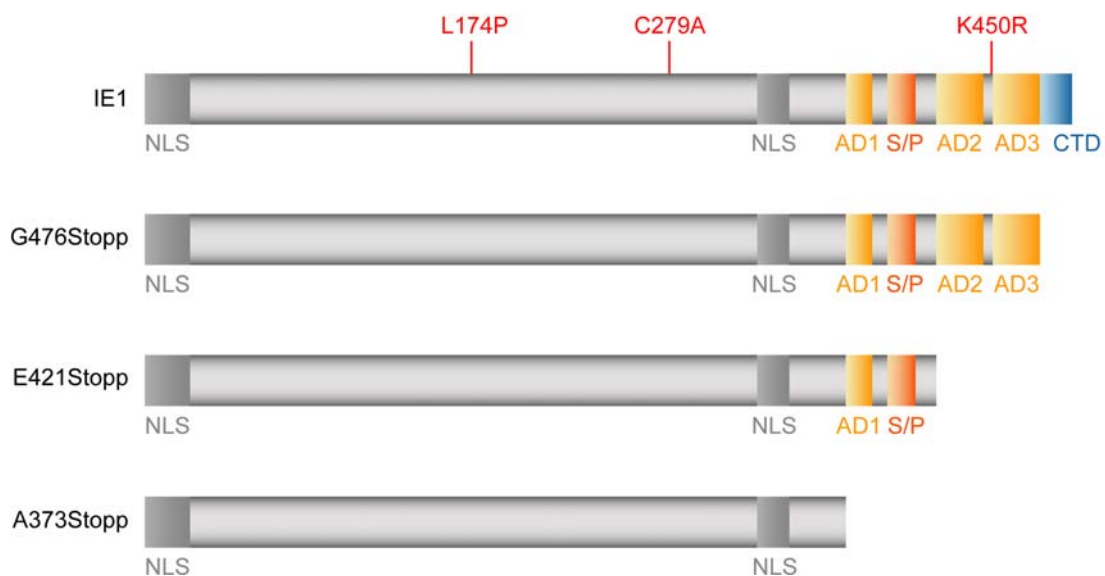


Abb. 4.18: Schematische Übersicht des HCMV IE1-Proteins und wichtiger regulatorischer Domänen. Die Gesamtlänge des IE1-Proteins beträgt 491 Aminosäuren (As). In rot sind zusätzlich die jeweiligen Punktmutanten gekennzeichnet. L174P stellt hierbei eine Punktmutation in einem Leucin-Zipper-ähnlichen Motiv dar. Bei C279A handelt es sich um eine Punktmutation innerhalb eines Zink-Finger-ähnlichen Motivs. In K450R wurde das für die SUMOylierung benötigte Lysin450 konservativ mutiert. Zusätzlich sind die drei verwendeten „Stopp-Mutanten“ (Einfügung eines Stopp-Codons an der entsprechenden Aminosäureposition) ihrer Größe nach abgebildet. NLS, nukleäres Lokalisationssignal; AD1, *acidic domain 1*: As 373-386; S/P, Serin-/Prolin-reiche Domäne: As 395-409; AD2, *acidic domain 2*: As 421-445; AD3, *acidic domain 3*: As 451-475; CTD, *chromatin tethering domain*: As 476-491.

Durch Expression drei verschiedener, carboxyterminal verkürzter IE1-Proteine (Abb. 4.18) wurde zu Beginn untersucht, wie sich das Fehlen der entsprechenden Bereiche im viralen Protein auf die Wechselwirkung mit STAT2 auswirkt. Außerdem wurde der Einfluss von verschiedenen Punktmutationen (Meinel, 2006) innerhalb funktionell wichtiger Motive des IE1-Proteins auf die STAT2-Bindung untersucht. Die drei „Stopp-Mutanten“ G476, E421 und A373 wurden so mutiert, dass es an der jeweiligen Position durch ein eingebautes Stopp-Codon zu einem Translationsabbruch kommt, was zu der Expression einer jeweils

verkürzten IE1-Form führt (Abb. 4.18, Meinel, 2006). Bei der Punktmutante L174P wurde innerhalb eines Leucin-Zipper-ähnlichen Motivs ein Leucin gegen ein Prolin ausgetauscht (Müller & Dejean, 1999). Der Bereich um die Aminosäure (As) 279 in IE1 gleicht einem Zink-Finger-Motiv, welches für die Vermittlung von Protein-DNA- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen bekannt ist. Hier sollten die Auswirkungen des Austausches eines Cysteins gegen ein Alanin untersucht werden. In einer letzten Punktmutante wurde Lysin450 durch Arginin ersetzt (Abb. 4.18). Diese Mutation interferiert mit der SUMOylierung des IE1-Proteins (Nevels *et al.*, 2004a). Sowohl die Stopp- als auch die Punktmutanten wurden als fertige Plasmidkonstrukte in Form von GFP-Fusionen aus der Arbeitsgruppe übernommen (Herstellung und Charakterisierung der GFP-Konstrukte, Meinel, 2006; Hauer, 2007).

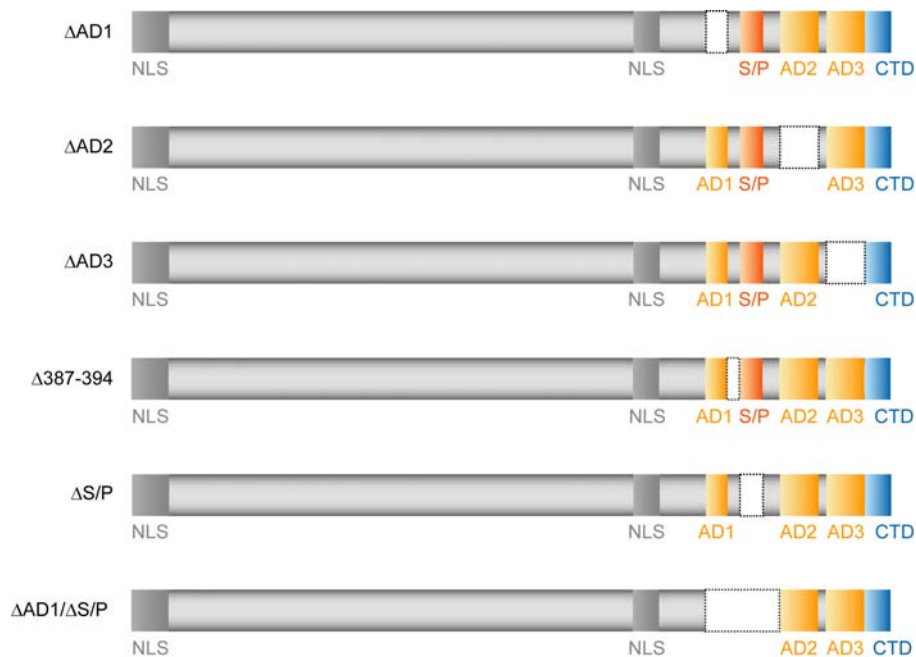


Abb. 4.19: Darstellung der neu hergestellten Deletionsmutanten von HCMV IE1. Der gestrichelt umrandete weiße Bereich entspricht der jeweils deletierten Region im IE1-Protein. Δ AD1: Δ As 373-386, Δ AD2: Δ As 421-445, Δ AD3: Δ As 451-475, Δ S/P: Δ As 395-409, Δ AD1/ Δ S/P: Δ As 373-420. Zu den dargestellten Motiven (NLS, AD1-3, S/P, CTD) siehe Abbildung 4.18.

Zusätzlich wurden, ausgehend von einem GFP-IE1-Konstrukt (Nr. 473, Tab. 3.6), verschiedene Mutanten mit kleinen internen Deletionen hergestellt, um die Bedeutung einzelner regulatorischer Motive in der carboxyterminalen Region von IE1 gezielter untersuchen zu können (Abb. 4.19). Die jeweiligen Deletionen wurden durch PCR-Mutagenese (3.4.3) in das entsprechende GFP-IE1-Konstrukt eingebracht und die

Auswirkungen der deletierten Regionen auf die Interaktion mit STAT2 anschließend durch Immunfluoreszenz-Analyse und Immunpräzipitation untersucht.

4.5.1 Für die subnukleäre Kolokalisation mit STAT2 wichtige Bereiche im IE1-Protein

Um die für die nukleäre Kolokalisation mit STAT2 kritischen Bereiche im IE1-Protein zu kartieren, wurden die verschiedenen GFP-IE1-Konstrukte durch CaPO_4 -Transfektion in 2fTGH-Zellen eingebracht, die nukleäre STAT2-Translokation durch Zugabe von $\text{IFN-}\alpha$ (1000 U/ml, 1 h) induziert und die Lokalisation beider Proteine im Anschluss durch Doppelfärbung detektiert.

Die Auswertung erfolgte wiederum unter Berücksichtigung der drei typischen Verteilungsmuster von IE1 im Kern von Interphase- und mitotischen Zellen (4.4.3.1). Das prozentuale Verhältnis der einzelnen Verteilungsmuster war vergleichbar mit den unter 4.4.3.1 aufgeführten Werten. Die Analyse der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab für das Wildtyp-IE1-Konstrukt die erwartete Kolokalisation mit STAT2 an PML-Körpern und Chromatin (Abb. 4.20, A). Als Kontrolle wurde zusätzlich GFP alleine transfiziert. Hier zeigte sich eine diffuse Verteilung des Proteins über die gesamte Zelle (Abb. 4.20, E). Bei Transfektion der G476-Stopp-Mutante konnte, aufgrund der fehlenden Chromatinbindedomäne (CTD), keine Kolokalisation am Chromatin nachgewiesen werden. Die Kolokalisation von IE1 und STAT2 an PML-Körpern war jedoch unbeeinflusst (Abb. 4.20, B). Für die E421-Stopp-Mutante zeigte sich trotz der fehlenden sauren Domänen AD2 und AD3 ein sehr ähnliches Bild (Abb. 4.20, C). Die CTD scheint somit zwar tatsächlich für die Chromatin-Assoziation des viralen Proteins essentiell zu sein, für die Kolokalisation von IE1 und STAT2 jedoch keine Rolle zu spielen. Ebenso wenig sind die AD2- und AD3-Domänen dafür notwendig. Der A373-Mutante fehlt im Vergleich zu den anderen beiden Stopp-Mutanten zusätzlich noch die AD1- und die Serin/Prolin-reiche (S/P) Region, also fast der gesamte funktionale carboxyterminale Bereich. Dementsprechend konnte keine Kolokalisation zwischen STAT2 und dem entsprechend trunkierten IE1-A373-Protein festgestellt werden, weder am Chromatin noch an den PML-Körpern (Abb. 4.20, D).

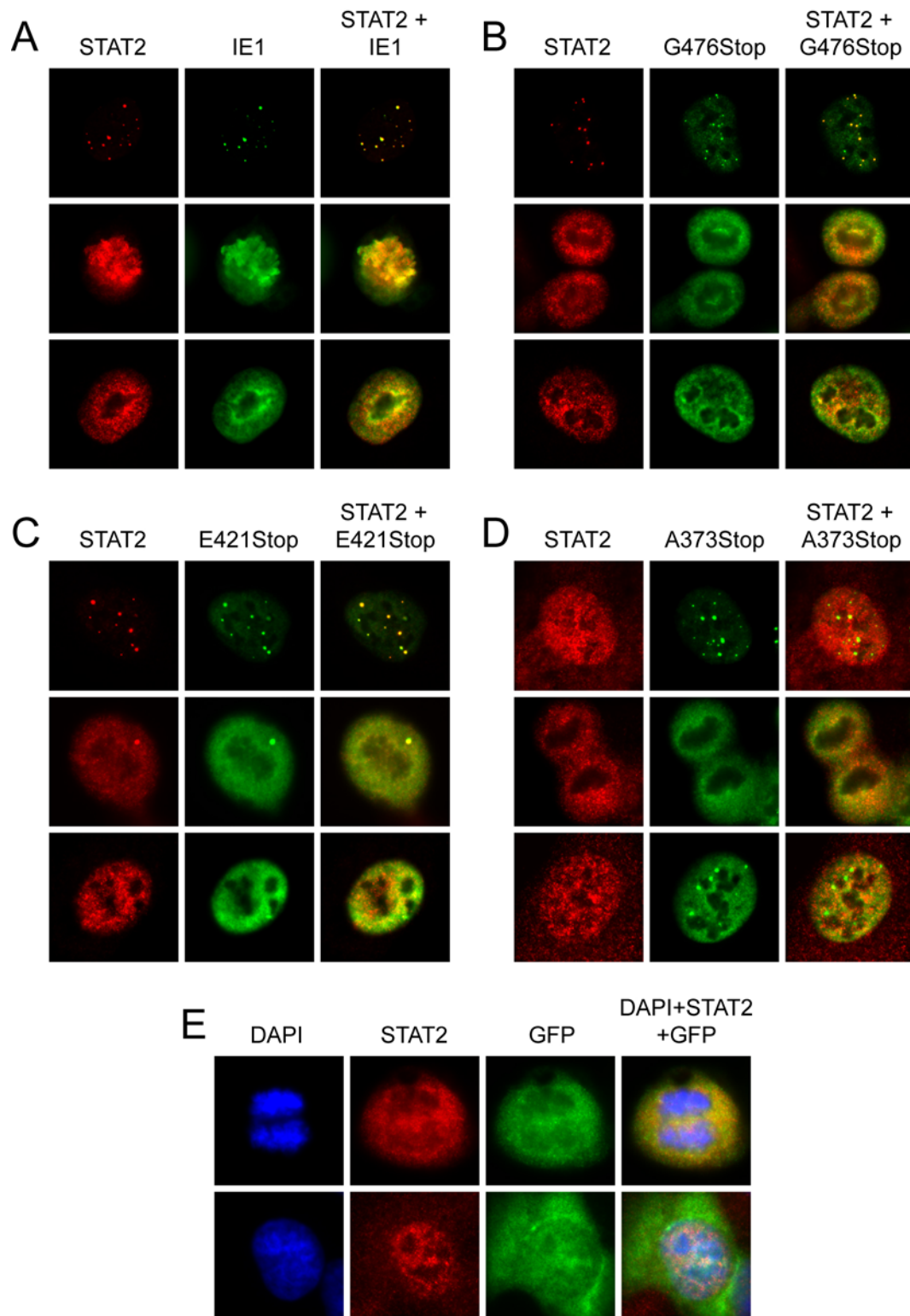


Abb. 4.20: Kolokalisationsstudien zwischen STAT2 und IE1-Stopp-Mutanten. Für indirekte Immunfluoreszenzen wurden 2fTGH-Zellen mit dem jeweiligen GFP-IE1-Konstrukt transfiziert und für 1 h mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt. Eine Doppelfärbung mit einem monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper in Kombination mit einem polyklonalen Serum gegen STAT2 und einer anschließenden Inkubation mit Konjugaten von Alexa Fluor 488 (anti-Maus) und Alexa Fluor 594 (anti-Kaninchen) diente zur Detektion. (A) Charakteristische Kerne mit punktartiger (obere Reihe), mit Chromosomen-assoziiierter (mittlere Reihe) oder diffuser (untere Reihe) Lokalisation von GFP-Wildtyp-IE1 und STAT2. (B-D) Lokalisation der IE1-Stopp-Mutanten und STAT2. (A-D) Zusätzlich abgebildet ist die Überlagerung des roten und grünen Farbfilter. (E) Kontrollansatz, Lokalisation von GFP und STAT2. Zusätzlich abgebildet sind die DAPI-Färbung des Chromatins und die Überlagerung aller Farbfilter.

Im Blick auf die Punktmutanten, hatte die C279A-Mutation keinen Einfluss auf die Kolokalisation zwischen IE1 und STAT2 (Abb. 4.21, A). Wildtyp-ähnlich verhielt sich auch die K450R-Mutante (Abb. 4.21, B). Die SUMOylierung des viralen Proteins wird also offensichtlich nicht für die Kolokalisation mit STAT2 benötigt. Das IE1-L174P-Protein konnte, wie beschrieben, nicht mehr mit PML-Körpern interagieren (Müller & Dejean, 1999) und war dementsprechend ausschließlich diffus im Zellkern verteilt (Abb. 4.21, C).

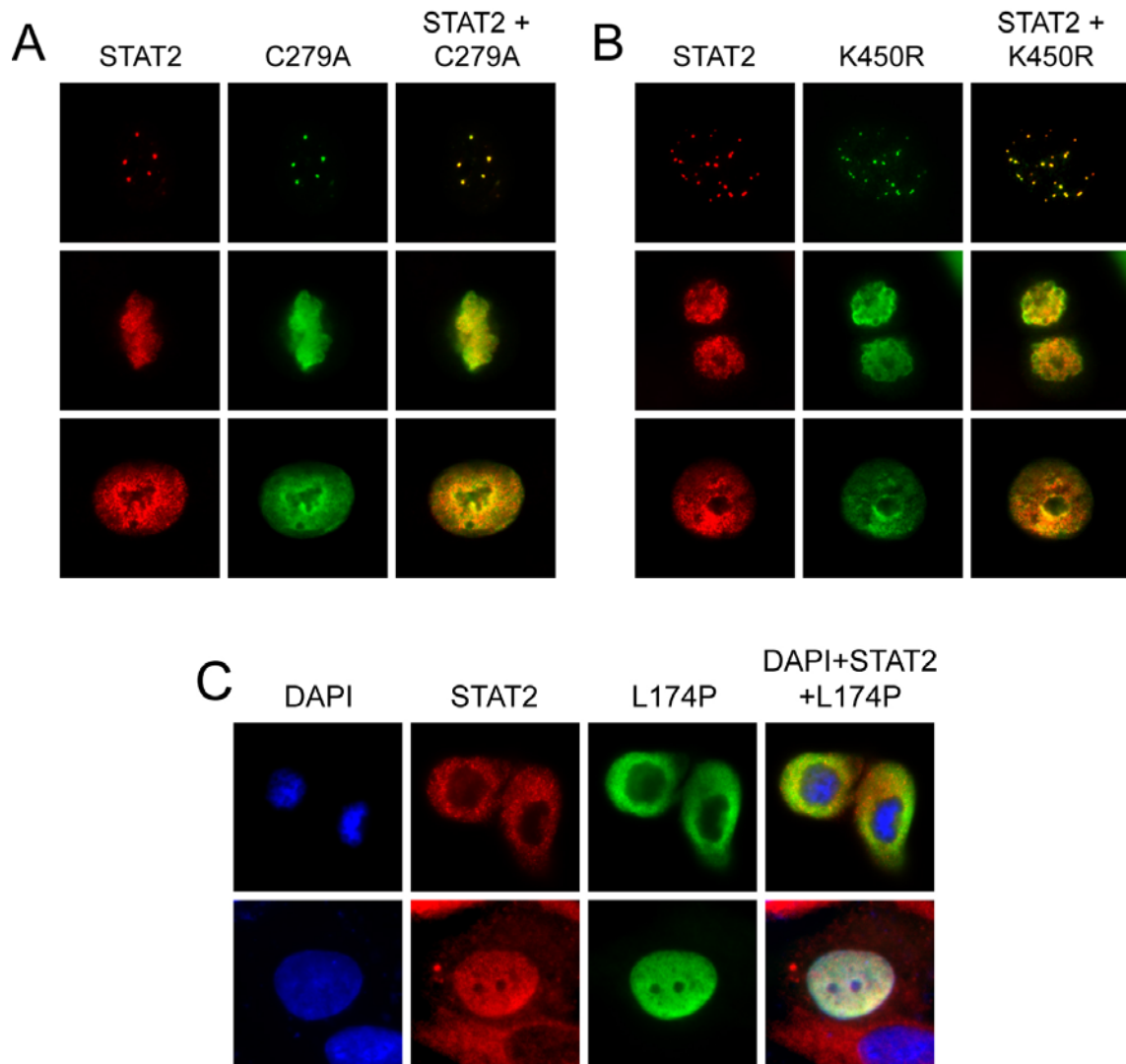
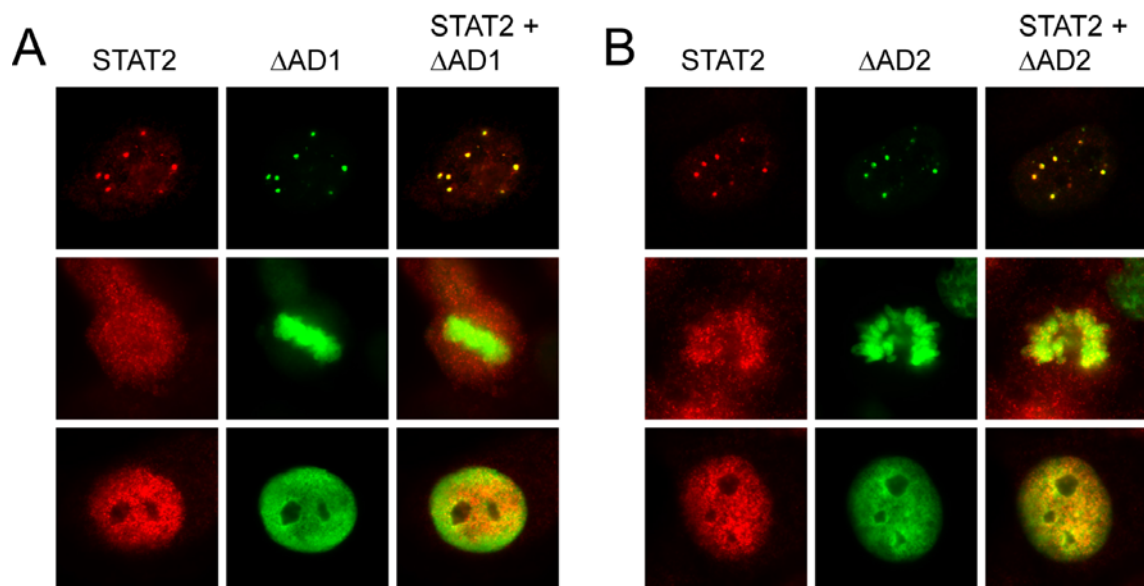


Abb. 4.21: Kolokalisationsstudien zwischen STAT2 und IE1-Punktmutanten. Für indirekte Immunfluoreszenzen wurden 2fTGH-Zellen mit dem jeweiligen GFP-IE1-Konstrukt transfiziert und für 1 h mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt. Die Detektion erfolgte durch Doppelfärbung mit einem monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper in Kombination mit einem polyklonalen Serum gegen STAT2 und einer anschließenden Inkubation mit Konjugaten von Alexa Fluor 488 (anti-Maus) und Alexa Fluor 594 (anti-Kaninchen). (A-B) Charakteristische Kerne mit punkartiger (obere Reihe), Chromosomen-assoziiierter (mittlere Reihe) oder diffuser (untere Reihe) Lokalisation. Kolokalisation von IE1-C279A und IE1-K450R mit STAT2. Zusätzlich abgebildet ist die Überlagerung des roten und grünen Farbfilter. (C) Lokalisation von IE1-L174P und STAT2. Zusätzlich abgebildet sind die DAPI-Färbung des Chromatins und die Überlagerung aller Farbfilter.

Eine Assoziation mit Chromatin konnte überraschenderweise ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.21, C). Bezüglich der Kolokalisation mit STAT2 verhielt sich die L174P-Mutante also nicht informativ.

Schließlich wurde der jeweilige Beitrag der einzelnen AD- und S/P-Motive im carboxyterminalen Abschnitt von IE1 zur Wechselwirkung mit STAT2 mit entsprechenden internen Deletionsmutanten (Abb. 4.19) detaillierter untersucht. Da die Ergebnisse der IE1-Stopp-Mutanten (Vergleich zwischen IE1-E421Stopp und IE1-A373Stopp) darauf hindeuteten, dass der die AD1- und S/P-Region umfassende Bereich des carboxyterminalen Abschnittes die Wechselwirkung mit STAT2 vermitteln könnte, wurde dieser Bereich zusätzlich zur Deletion der jeweils einzelnen AD- und S/P-Motive komplett entfernt (Abb. 4.19, unten). In einer weiteren Mutante wurde außerdem der Bereich zwischen AD1 und S/P (As 387-394; Abb. 4.19) spezifisch deletiert. Bei Auswertung der indirekten Immunfluoreszenzen zeigten die jeweils einzelnen Deletionen der Bereiche AD1, AD2, AD3 und S/P jedoch auf den ersten Blick keinen wesentlichen Einfluss auf die Kolokalisation zwischen IE1 und STAT2 an PML-Körpern (Abb. 4.22). Nach Quantifizierung von jeweils 500 Zellkernen mit punktartiger Verteilung von IE1 ergab sich dementsprechend, dass nach Deletion der Regionen AD1, AD3, S/P und Δ 387-394 die Kolokalisationshäufigkeit jeweils zwischen 80% und 90% lag und somit vergleichbar mit der des IE1-Wildtyp-Proteins (87%) war.



Fortsetzung nächste Seite.

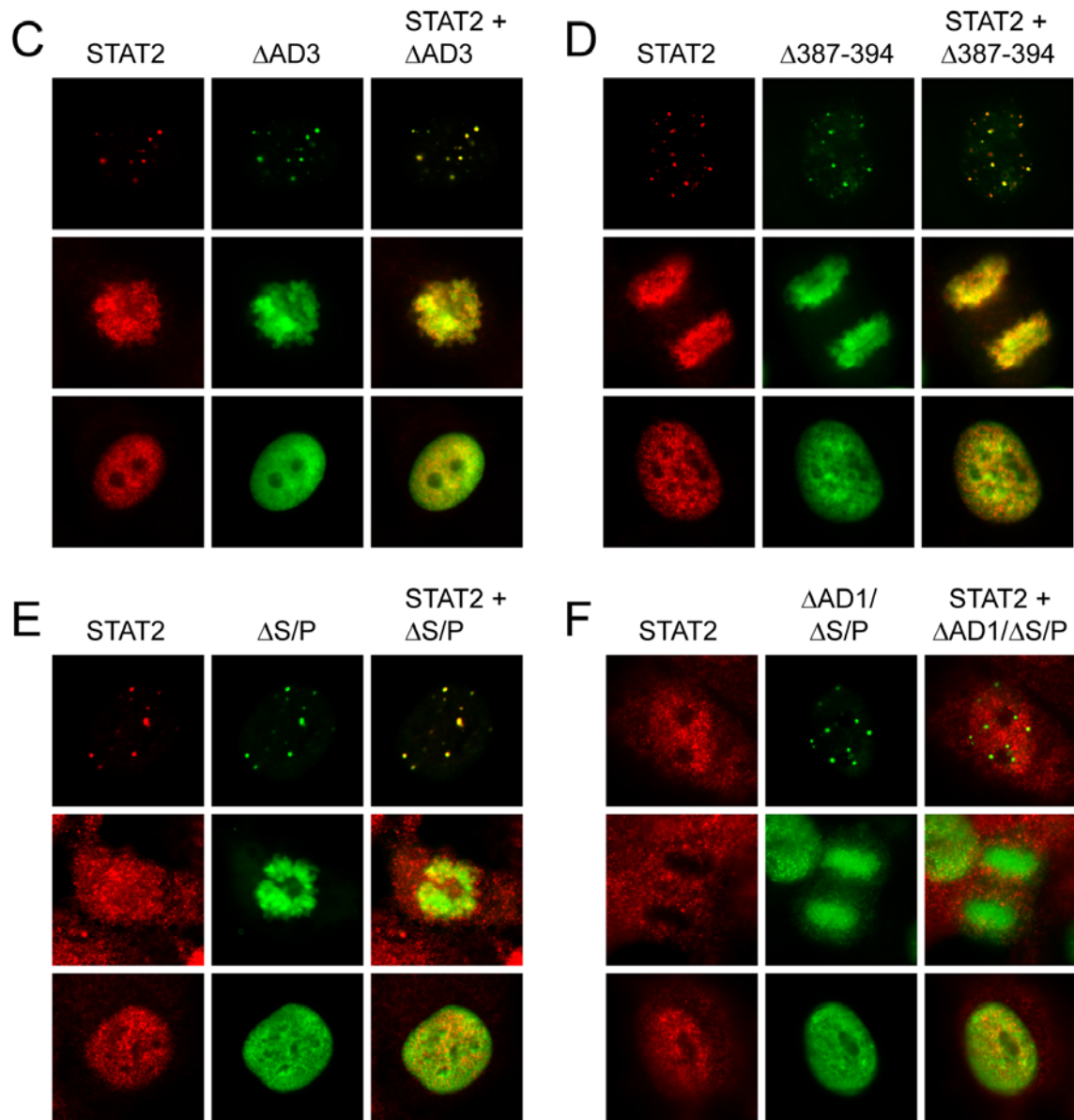


Abb. 4.22: Kolokalisationsstudien zwischen STAT2 und internen IE1-Deletionsmutanten. Für indirekte Immunfluoreszenzen wurden 2fTGH-Zellen mit dem jeweiligen IE1-Konstrukt transfiziert und für 1 h mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt. Eine Doppelfärbung mit einem monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper in Kombination mit einem polyklonalen Serum gegen STAT2 und einer anschließenden Inkubation mit Konjugaten von Alexa Fluor 488 (anti-Maus) und Alexa Fluor 594 (anti-Kaninchen) diente zur Detektion. (A-F) Charakteristische Kerne mit punktartiger (obere Reihe), Chromosomen-assoziiierter (mittlere Reihe) oder diffuser (untere Reihe) Lokalisation der IE1-Deletionsmutanten und STAT2. Zusätzlich abgebildet ist jeweils die Überlagerung des roten und grünen Farbfilters.

Bei Fehlen der AD2-Region konnte allerdings aufgrund dieser quantitativen Auswertung nur noch in 45% der PML-Körper eine Kolokalisation zwischen IE1 und STAT2 nachgewiesen werden. Beim gemeinsamen Fehlen von AD1 und S/P konnte gar keine entsprechende Kolokalisation (0%) mehr festgestellt werden. Diese Daten zeigen, dass für die Kolokalisation zwischen IE1 und STAT2 an PML-Körpern ein AD1- und S/P-umfassender Bereich im carboxyterminalen Abschnitt des viralen Proteins essentiell ist,

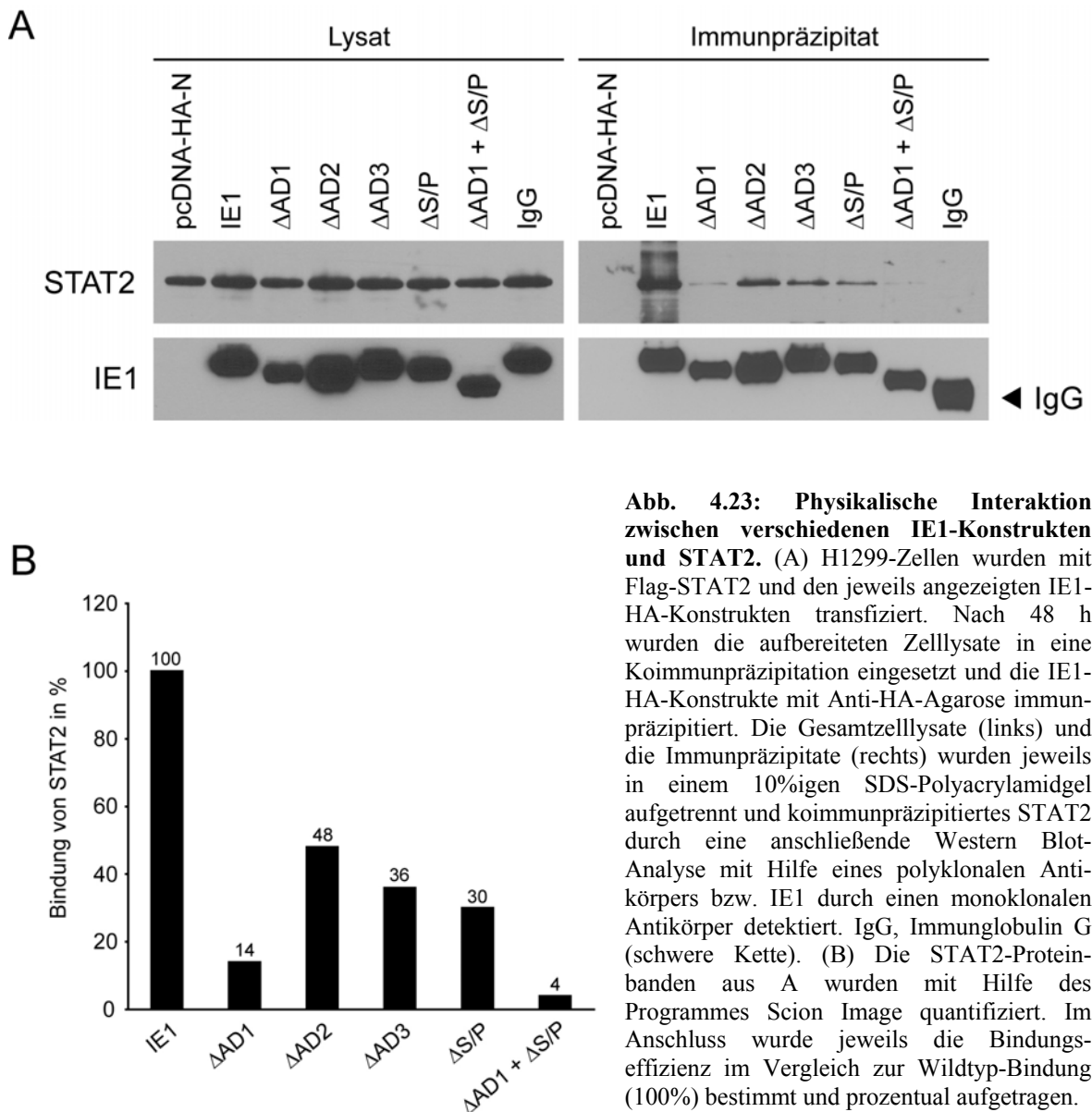
während das AD2-Motiv dabei offenbar eine unterstützende Funktion übernimmt. Weiter wurden die Auswirkungen der einzelnen internen Deletionen auf die Kolokalisation von IE1 und STAT2 an mitotischem Chromatin untersucht. Wie schon an den PML-Körpern, zeigten hier weder Δ AD3 noch Δ 387-394 einen negativen Einfluss auf die Kolokalisation (Abb. 4.22, C und D). Auch die AD2-Region, die bei der Kolokalisation an PML-Körpern unterstützend beteiligt zu sein scheint, spielte keine wesentliche Rolle für die Assoziation von IE1 und STAT2 am kondensierten Chromatin (Abb. 4.22, B). Dagegen zeigte wiederum die gemeinsame Deletion der AD1- und S/P-Region den größten Einfluss. STAT2 konnte in diesem Fall nicht mehr kolokalisieren, wohingegen das mutierte IE1-Protein selbst noch mit Chromatin assoziierte (Abb. 4.22, F). Überraschenderweise interferierte hier auch die jeweils einzelne Deletion von AD1 oder S/P mit der IE1-STAT2 Kolokalisation. Für STAT2 konnte nur eine äußerst schwache, diffuse Färbung des Chromatins nachgewiesen werden (Abb. 4.22, A und 4.22, E).

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Immunfluoreszenzstudien lassen insgesamt eindeutig darauf schließen, dass dem sauren (AD1) und Serin/Prolin-reichen (S/P) Motiv, im carboxyterminalen Bereich zwischen den As 373 und 409 des HCMV IE1-Proteins, eine essentielle Funktion bei der subzellulären Kolokalisation mit dem STAT2-Protein zukommt. Damit war auch zu erwarten, dass dieser Abschnitt im viralen Protein eine kritische Rolle bei der physikalischen Interaktion mit dem zellulären Regulatorprotein übernimmt.

4.5.2 Für die Bindung an STAT2 wichtige Bereiche im IE1-Protein

Die Kolokalisationsstudien zwischen IE1 und STAT2 durch Immunfluoreszenzstudien dienten nur als indirekter Hinweis auf die physikalische Interaktion beider Proteine. Zur Bestätigung einer physikalischen Bindung zwischen den einzelnen IE1-Varianten und STAT2 wurden zusätzlich Koimmunpräzipitationen (3.5.6) durchgeführt. Bei Verwendung der GFP-Konstrukte konnten keine zufrieden stellenden Immunpräzipitationen erzielt werden. Selbst die sehr effiziente Wechselwirkung zwischen Wildtyp-IE1 und STAT2 (Abb. 4.14) konnte mit einem IE1-GFP-Fusionprotein nur sehr schwach nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen GFP-IE1-Konstrukte in einen pcDNA-HA-Vektor subkloniert. Die neuen pcDNA-HA-Konstrukte wurden zusammen mit Flag-STAT2 durch CaPO_4 -Präzipitation in H1299-Zellen transfiziert und die nach 48 h präparierten Zelllysate in eine Immunpräzipitation eingesetzt. In einer anschließenden

Western Blot-Analyse konnte das kopräzipitierte STAT2 nachgewiesen werden. Die aufgetragenen Zelllysate zeigten sowohl für STAT2 als auch für IE1 annähernd gleiche Proteinmengen (Abb. 4.23, A). Geringe Schwankungen zwischen den einzelnen IE1-Konstrukten konnten auch bei mehrmaliger Durchführung des Experiments nicht vermieden werden und kamen höchstwahrscheinlich durch unterschiedliche Transfektions-Effizienzen und/oder Proteinstabilitäten (im Falle von IE1) der einzelnen Konstrukte zustande.



Wie bereits unter 4.4.3.2 gezeigt, konnte auch bei diesen Immunpräzipitationen eine sehr gut nachweisbare physikalische Interaktion zwischen Wildtyp-IE1 und STAT2 gezeigt werden (Abb. 4.23). Die Deletion des AD2- oder AD3-Motivs verhinderte zwar die IE1-

STAT2 Bindung nicht, hatte aber einen deutlich messbaren negativen Effekt auf die Interaktionseffizienz (48% bzw. 36%; Abb. 4.23, B). Bei Deletion der S/P-Region betrug die Bindungseffizienz zwischen STAT2 und IE1 nur noch 30% und sank bei Δ AD1 auf nur 14% ab. Bei der gemeinsamen Deletion von Δ AD1 und Δ S/P wurde die untere Nachweisgrenze erreicht (Bindungseffizienz 4%; Abb. 4.23). Trotz quantitativer Unterschiede, vor allem im Hinblick auf die AD2- und AD3-Motive, bestätigen diese Ergebnisse im Wesentlichen die Beobachtungen der Kolo-kalisationstudien, die bereits eine kritische Rolle der AD1- und S/P-Domänen für die IE1-STAT2 Interaktion nahe legten (4.5.1). Die Immunpräzipitation stellt gegenüber der Immunfluoreszenz die sensitivere Methode zum Nachweis von Protein-Wechselwirkungen dar und ermöglicht somit offenbar den Nachweis von schwächeren Effekten, die aus Immunfluoreszenz-Analysen nicht ohne weiteres ersichtlich werden.

4.5.3 Für die Interaktion mit IE1 wichtige Bereiche im STAT2-Protein

Neben einer genaueren Kartierung der für eine Wechselwirkung mit STAT2 relevanten Bereiche in IE1-Protein (4.5.2), wurden ergänzend die dazu benötigten Proteinabschnitte des zellulären Interaktionspartners näher untersucht. Hierzu wurde ein Wildtyp-STAT2-GFP-Konstrukt zusammen mit sechs verschiedenen STAT2-Mutanten (Tab. 3.6) in weitere Kolo-kalisationsstudien mit IE1 eingesetzt (Abb. 4.24). Bei einer aminoterminalen STAT2-Mutante (Δ N235) konnte schon in früheren Experimenten keine nukleäre Akkumulation beobachtet werden (Kaps, 2006), da hier wichtige Bereiche eines Kernlokalisationssignals fehlen (Banninger & Reich, 2004). Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe ein neues Plasmidkonstrukt generiert, das neben einer aminoterminalen Deletion zusätzlich ein nukleäres Lokalisationssignal des *Large T Antigen* des Simian Virus 40 (SV40) enthält, um eine nukleäre Translokation dieser STAT2-Variante zu gewährleisten (STAT2- Δ N235-NLS; Kaps, 2006). Durch das zusätzlich eingefügte, heterologe NLS zeigte diese Mutante nach IFN-Behandlung eine eindeutig nukleäre Verteilung (Abb. 4.26, B).

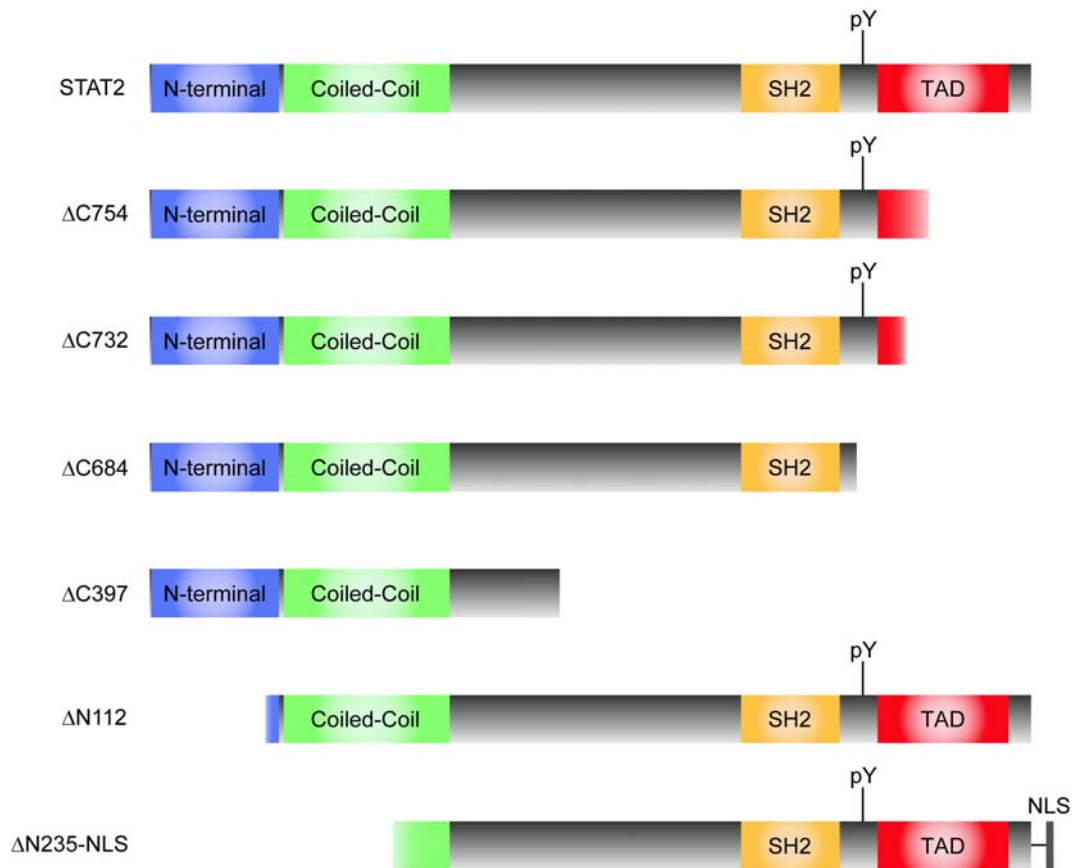


Abb. 4.24: Das STAT2-Protein und verwendete STAT2-Mutanten. Gezeigt sind das Wildtyp-STAT2-Protein (851 As) mit konservierten, regulatorischen Regionen und die für die indirekte Immunfluoreszenz verwendeten carboxy- und aminoterminalen Mutanten. N-terminal, Stabilisierung der STAT Dimer-Wechselwirkung; *coiled-coil*, allgemeine Protein-Interaktionsdomäne; SH2, Src Homologie 2 Domäne, bindet Phosphotyrosin, benötigt für Rezeptorbindung und Dimerisierung; TAD, Transaktivator-Domäne, reguliert transkriptionelle Funktionen und vermittelt Wechselwirkung mit nukleären Koaktivatoren; pY, phosphorylierter Tyrosinrest → Aktivierung des STAT-Moleküls; NLS, nukleäres Lokalisationssignal.

Zur Untersuchung der Kolo-kalisation der verschiedenen STAT2-GFP-Konstrukte mit dem IE1-Protein wurde die frisch isolierte Plasmid-DNA durch CaPO₄-Transfektion in IE1-exprimierende H1299-Zellen eingebracht. Nach 48 h erfolgte eine einstündige Behandlung der Zellen mit IFN-α (1000 U/ml) bevor diese nach Standardprotokoll auf einem Deckgläschen fixiert wurden. Wie zu erwarten, konnte für das STAT2-Wildtyp-Protein eine eindeutige Kolo-kalisation mit IE1 sowohl an PML-Körpern als auch am mitotischen Chromatin nachgewiesen werden (Abb. 4.25, A). Ein vergleichbares Bild bot sich auch bei STAT2-ΔC754, STAT2-ΔC732 und STAT2-ΔC684 (Abb. 4.25, B-D). Für STAT2-ΔC397 und STAT2-ΔN235-NLS konnte dagegen keine Kolo-kalisation mit IE1 nachgewiesen werden (Abb. 4.25, E und 4.26, B). Interessanterweise hatte die ΔN112-Deletion zwar keinen Einfluss auf eine Kolo-kalisation mit IE1 an PML-Körpern, verhinderte jedoch eine Interaktion beider Proteine am Chromatin (Abb. 4.26, A).

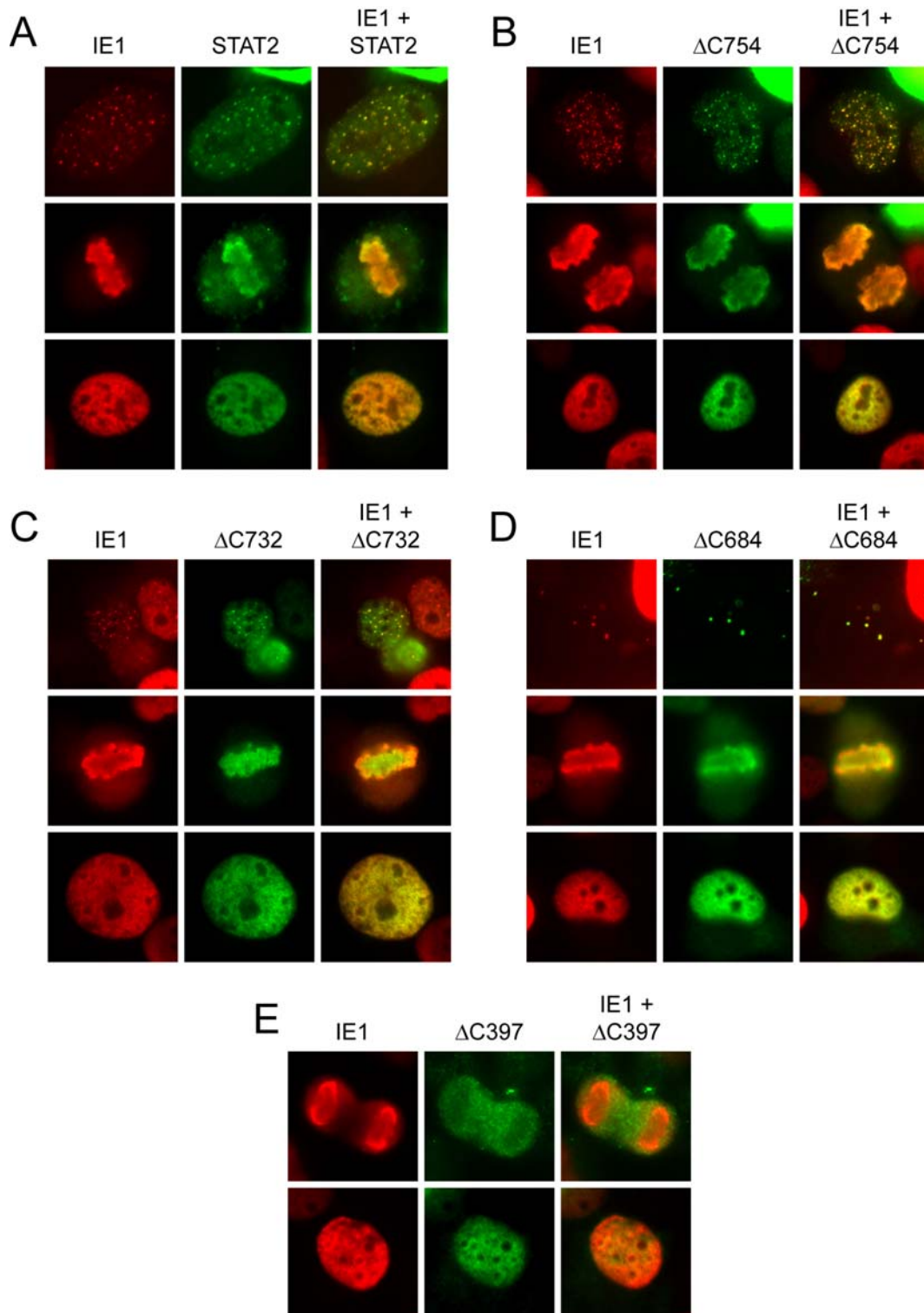


Abb. 4.25: Kolokalisationsstudien zwischen IE1 und carboxyterminalen STAT2-Mutanten. Für indirekte Immunfluoreszenzen wurden IE1-exprimierende H1299-Zellen mit dem jeweiligen STAT2-GFP-Konstrukt transfiziert und für 1 h mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt. Eine Doppelfärbung mit einem polyklonalen GFP-spezifischen Serum in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper gegen IE1 und einer anschließenden Inkubation mit Konjugaten von Alexa Fluor 488 (anti-Kaninchen) und Texas Red (anti-Maus) diente zur Detektion. (A) Charakteristische Kerne mit punktartiger (obere Reihe), Chromosomen-assoziiierter (mittlere Reihe) oder diffuser (untere Reihe) Lokalisation von IE1 und STAT2-GFP. (B-E) Nukleäre Kolokalisation zwischen IE1 und carboxyterminal verkürzten STAT2-GFP-Konstrukten. Zusätzlich abgebildet ist jeweils die Überlagerung des roten und grünen Farbfilters.

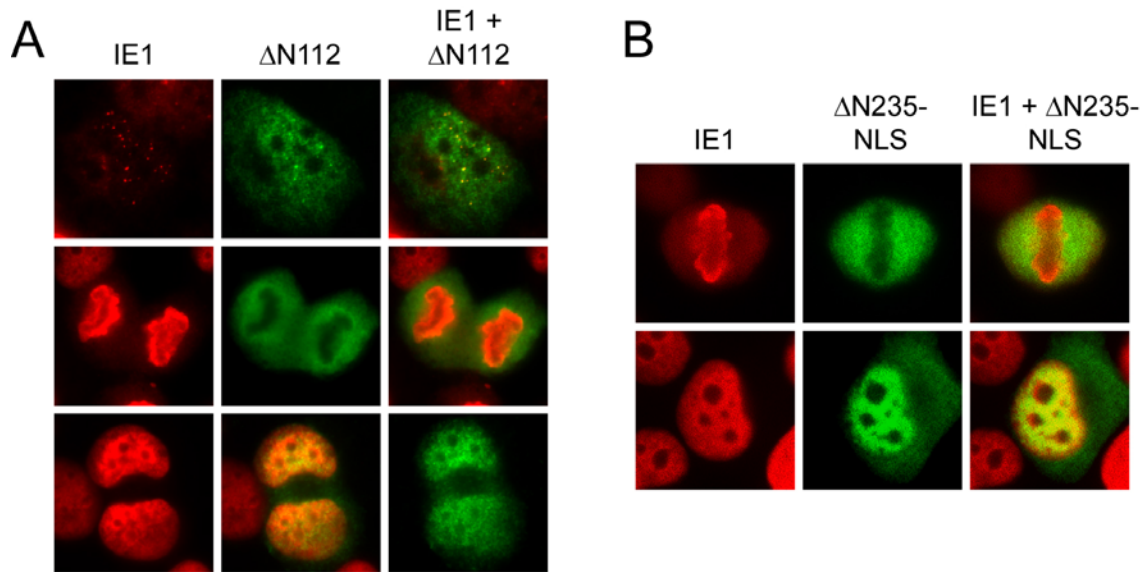


Abb. 4.26: Kolokalisationsstudien zwischen IE1 und aminoterminalen STAT2-Mutanten. Für indirekte Immunfluoreszenzen wurden IE1-exprimierende H1299-Zellen mit dem jeweiligen STAT2-GFP-Konstrukt transfiziert und für 1 h mit IFN- α (1000 U/ml) behandelt. Eine Doppelfärbung mit einem polyklonalen GFP-spezifischen Serum in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper gegen IE1 und einer anschließenden Inkubation mit Sekundärkonjugaten von Alexa Fluor 488 (anti-Kaninchen) und Texas Red (anti-Maus) diente zur Detektion. (A) Nukleäre Lokalisation von IE1, STAT2 Δ N112 mit punktartiger (obere Reihe), Chromosomen-assoziiierter (mittlere Reihe) und diffuser (untere Reihe) Lokalisation. (B) Nukleäre Kolokalisation zwischen IE1 und STAT2 Δ N235-NLS mit Chromosomen-assoziiierter (obere Reihe) und diffuser (untere Reihe) Lokalisation. Zusätzlich abgebildet ist jeweils die Überlagerung des roten und grünen Farbfilters.

Zusammenfassend konnte aufgrund der Experimente mit verschiedenen IE1-Konstrukten der carboxyterminale Abschnitt des viralen Proteins, insbesondere die AD1- und S/P-umfassende Region, als entscheidender Bereich für eine Bindung an STAT2 ausgemacht werden (4.5.2). Anhand der oben beschriebenen Immunfluoreszenz-Daten mit verschiedenen STAT2-Varianten konnte dagegen ein aminoterminaler Abschnitt (N-terminale und *coiled-coil* Domäne) des zellulären Interaktionspartners als für die Interaktion mit IE1 vermutlich kritischer Bereich identifiziert werden. Über diese aminoterminalen Domänen interagiert STAT2 auch mit mehreren wichtigen zellulären Bindungspartnern, einschließlich IRF9.

5 Diskussion

5.1 Die Koevolution zwischen der IFN-vermittelten Immunantwort und dem HCMV

Für die Abwehr und Kontrolle von Virusinfektionen haben Säugetiere im Laufe der Evolution das IFN-System als einen effizienten, schnellen Mechanismus der angeborenen Immunantwort entwickelt. Die Koevolution zwischen Virus und Wirt führte im Gegenzug auch bei Viren zur Etablierung zahlreicher Strategien, um dieser ersten antiviralen Antwort des betroffenen Organismus erfolgreich zu entkommen (Weber *et al.*, 2004; Hengel *et al.*, 2005). Die Herpesviren einschließlich HCMV konnten diese Strategien perfektionieren, so dass eine vollständige Eliminierung durch den Wirt verhindert wird. Neben anderen Immunevasionsmechanismen, ermöglicht die Inhibition der IFN-Antwort dem Virus in einem ruhenden Stadium, der so genannten „Latenz“, im betroffenen Organismus zu überdauern (Vancikova & Dvorak, 2001; Scalzo *et al.*, 2007; DeFilippis, 2007).

Bei einer Reaktivierung aus dieser Latenz oder nach Primärinfektion kann es zu einer lytischen Vermehrung des HCMV kommen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die produktive HCMV-Infektion die zelluläre Genexpression auf unterschiedlichste Weise beeinflusst. Hierbei konnte früh im Infektionsverlauf beobachtet werden, dass bei Inhibition der Proteinneusynthese bzw. bei Infektion mit UV-inaktivierten Viren eine größere Anzahl an zellulären mRNAs akkumulierte als unter normalen Infektionsbedingungen. Viele dieser mRNAs codierten für antivirale Genprodukte wie ISG-Proteine oder IFN- β . Diese Daten ließen vermuten, dass mindestens ein unmittelbar nach Infektion neu synthetisiertes HCMV-Genprodukt diese erste zelluläre antivirale Antwort unterdrücken kann (Browne *et al.*, 2001). Diese Beobachtung bildete den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

5.2 Das HCMV IE1-Protein und die Phase 1 der IFN-Antwort

Die erste Phase der antiviralen IFN-Antwort ist durch eine transkriptionelle Aktivierung von IFN- und ISG-Promotoren gekennzeichnet, die selber nicht von den Zytokinen der IFN-Gruppe abhängig ist. Diese IFN/ISG-Induktion in Phase 1 der IFN-Antwort wird unter

anderem durch bestimmte *toll-like* Rezeptoren und das DNA-bindende Protein IRF3 als wichtigem Kofaktor vermittelt (Takeda & Akira, 2005; DeFilippis *et al.*, 2006). Bereits die Fusion von Virushülle und Zytoplasmamembran nach Anheftung des Virus führt über mehrere Zwischenschritte zu einer Aktivierung (Phosphorylierung) des konstitutiv exprimierten IRF3 (Boehme *et al.*, 2004). Untersuchungen zur Aktivierung von IRF3 in HSV1- und HCMV-infizierten Zellen haben hierbei Zelltyp-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Induktion der zellulären Antwort ergeben (Preston *et al.*, 2001). Nach Phosphorylierung transloziert IRF3 in den Zellkern und induziert dort unter Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren die Transkription des IFN- β -Gens und einiger ISG (Lin *et al.*, 1998; Yoneyama *et al.*, 1998).

Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt wurde (Taylor & Bresnahan, 2005), bestätigen die aktuellen Ergebnisse, dass IE1 keinen wesentlichen Einfluss auf die HCMV-induzierte Transkription des IFN- β -Gens hat (Abb. 4.1, A). Dagegen ist das zweite Hauptprodukt der MIE-Region, das 86kDa IE2-Protein, in der Lage die Induktion des IFN- β -Gens zu unterdrücken (Taylor & Bresnahan, 2005). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass IE2 den Transkriptionsfaktor NF κ B an der Bindung im IFN- β -Promotor hindert, was eine verringerte Transkription des IFN- β -Gens zur Folge hat (Taylor & Bresnahan, 2006).

In den frühen Stadien einer HCMV-Infektion in Fibroblasten kommt es neben der Synthese von IFN- β auch zu einer IFN-unabhängigen Induktion einer Vielzahl von ISG (Zhu *et al.*, 1997 und 1998; Navarro *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass das UL83-codierte Tegumentprotein pp65, das unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese mit dem Viruspartikel in die Zelle gelangt, der Induktion einiger ISG entgegenwirken kann (Browne & Shenk, 2003). Für pp65 wurde unter anderem eine Interaktion mit IRF3 beschrieben, die dessen Aktivierung vermindert (Abate *et al.*, 2004). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, handelt es sich jedoch auch bei der initialen ISG-Induktion um einen Prozess der weder durch IE1 induziert noch von selbigem moduliert wird (Abb. 4.2, B; Abb. 4.3). Diese initiale ISG-Induktion nach Infektion scheint unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese zu sein, da bei Inhibition der Translation durch CHX sowohl das Wildtyp-Virus als auch die IE1-defiziente Mutante nach 6 h eine gleich starke ISG54-Transkription hervorrufen (Abb. 4.3). Eine vergleichbare, jedoch etwas schwächere initiale Induktion des ISG54 und anderer ISG wurde auch für HSV1 beschrieben (Nicholl *et al.*, 2000). Wie für das HCMV, trat die Induktion der ISG auch hier in Abwesenheit einer

Proteinneusynthese auf, so dass es sich um einen generellen Mechanismus der (Herpes)virus-vermittelten Stimulierung der angeborenen Immunantwort handeln könnte.

Im Normalfall führt die Aktivierung des IFN- β -Promotors zur Expression und anschließenden Sekretion von IFN- β . Wie die Experimente mit einem neutralisierenden Serum gegen das IFN- β -Protein zeigen, scheint das endogen sezernierte Zytokin jedoch keinen antiviralen Effekt auf eine produktive Vermehrung des Virus in Fibroblasten zu haben (Abb. 4.1, B). In Anbetracht der Tatsache, dass Fibroblasten hauptsächlich IFN- β und kaum andere IFN (z.B. IFN- α , IFN- γ) produzieren, wird die Wildtyp-HCMV-Infektion in diesem System also offensichtlich nicht wesentlich durch virusinduziertes (autokrines oder parakrines) IFN limitiert. Dagegen konnte die attenuierte Replikation einer IE1-spezifischen Virusmutante zumindest teilweise auf die antiviralen Eigenschaften von IFN- β zurückgeführt werden, da hier die Neutralisierung des Zytokins mit einem deutlichen Anstieg an Nachkommenviren einherging (Abb. 4.1, B). Während selbst bei hohen Konzentrationen an exogen zugesetztem IFN- α das Wildtyp-Virus replizieren konnte, wurde das Wachstum der IE1-defizienten Mutante unter diesen Bedingungen vollständig inhibiert (Abb. 4.1, A). Diese Daten verdeutlichen die zentrale Rolle des IE1-Proteins bei der IFN-Resistenz des HCMV.

5.3 Das HCMV IE1-Protein und die Phase 2 der IFN-Antwort

5.3.1 Blockierung der ISG-Induktion durch IE1

Im Anschluss an die initiale ISG-Induktion (Phase 1), tritt etwa 24 nach Infektion eine deutliche HCMV-vermittelte Repression der Transkription von ISG, einschließlich ISG54 und MxA, auf (Phase 2; Abb. 4.2). Für ISG54 wurde beschrieben, dass es mit dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF3 interagieren kann, dessen Phosphorylierung verhindert und somit die Translation inhibiert (Terenzi *et al.*, 2006). Die antiviralen Eigenschaften von MxA sind äußerst vielseitig und wurden bisher nur für RNA-Viren ausführlich beschrieben (Haller & Kochs, 2002). Hier können Mx-Proteine Nukleokapsid-ähnliche Strukturen erkennen und binden und so die Zusammensetzung neuer Nachkommenviren verhindern. Möglicherweise beeinflussen die Mx-Proteine während der HCMV-Infektion ähnliche Prozesse. Für eine effiziente Virusvermehrung ist

es für das HCMV daher wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung die antiviralen Funktionen von ISG54, MxA und anderen ISG zu unterdrücken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass das IE1-Protein maßgeblich an der Unterdrückung der ISG-Expression in der zweiten Phase der IFN-Antwort nach HCMV-Infektion beteiligt ist. Dafür spricht, neben den weiter unten (5.3.3 und 5.3.4) diskutierten Gründen, auch die Tatsache, dass diese Phase (im Gegensatz zur Phase 1) abhängig von der Proteinneusynthese ist und die Wirkung von IE1 zeitverzögert erfolgt (Abb. 4.2, B). Dabei konnten in IE1-exprimierenden Fibroblasten nach Induktion durch exogenes IFN- α ähnlich starke reprimierende Effekte auf die beiden untersuchten ISG (ISG54 und MxA) auch außerhalb des Viruskontextes beobachtet werden (Abb. 4.4). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Repression durch IE1 (weitgehend) unabhängig von anderen viralen Faktoren verursacht wird. Eine mögliche Erklärung für diese Unterdrückung der ISG liefert die Tatsache, dass das IE1-Protein als Inhibitor von zellulären Histondeacetylasen (HDAC) fungieren kann (Nevels *et al.*, 2004b). HDAC werden im Allgemeinen mit transkriptioneller Repression in Verbindung gebracht, sind jedoch erstaunlicherweise essentiell für die transkriptionelle Induktion von ISG (Chang *et al.*, 2004). Es wäre deshalb denkbar, dass das IE1-Protein als HDAC-Inhibitor indirekt die Induktion von ISG verhindert. Bisher liegen allerdings keine experimentellen Evidenzen für diesen Mechanismus vor. Im Gegensatz dazu führten weiterführende Untersuchungen dieser Arbeit zur Aufklärung eines anderen (vermutlich HDAC-unabhängigen) molekularen Mechanismus, der für die IE1-vermittelte Repression der zeitverzögerten ISG-Induktion verantwortlich ist (5.3.3 und 5.3.4).

Erst kürzlich wurde übrigens ein weiteres IE-Genprodukt, das TRS1/IRS1-Protein, beschrieben, dass die Funktionen der IFN-induzierten und dsRNA-aktivierten ISG-Proteine PKR (Garcia *et al.*, 2006) und OAS (Silverman, 1994) unterdrücken kann (Child *et al.*, 2004; Hakki & Geballe, 2005). Die direkte Interaktion der viralen Proteine mit PKR verhindert offenbar die PKR-Aktivierung, wodurch die Proteinsynthese aufrechterhalten wird (Hakki *et al.*, 2006).

5.3.2 Einfluss des IE1-Proteins auf die Akkumulation, Aktivierung und nukleäre Translokation der ISGF3-Komponenten

Für die IFN-abhängige Induktion der ISG (Phase 2 der IFN-Antwort) wird der trimere ISGF3-Komplex benötigt, der nach Bindung von sezerniertem Typ 1 IFN an den IFN- α/β -Rezeptor aus den dadurch aktivierten Komponenten STAT1, STAT2 und IRF9 gebildet wird (Schindler, 1999). Bei der Bestimmung der Gleichgewichtsmengen von STAT1, STAT2 und IRF9 in An- und Abwesenheit von IE1 konnten keine wesentlichen Unterschiede in den jeweiligen Proteinmengen festgestellt werden (Abb. 4.5). Ebenso wenig konnte das virale Protein die Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 nach IFN-Behandlung verhindern. Überraschenderweise wurde sogar ein gegenteiliger Effekt beobachtet, d. h. das IE1-Protein induzierte offenbar auch in Abwesenheit einer IFN-Stimulierung geringe Mengen an pSTAT1 und pSTAT2 (Abb. 4.5). Ähnliche Effekte konnten auch in infizierten Fibroblasten beobachtet werden, wo das Wildtyp-Virus eine stärkere STAT1/2-Phosphorylierung induzierte als eine IE1-defiziente Mutante (Kaps, 2006).

Das HCMV unterscheidet sich bezüglich seiner Interaktion mit der Jak-STAT-Signalkaskade offensichtlich von einigen RNA-Viren, von denen bekannt ist, dass sie bereits die Phosphorylierung der STAT-Proteine verhindern (Rodrigues *et al.*, 2002; Fimia *et al.*, 2004). Auch für eine HCMV-vermittelte Degradation von STAT2, wie sie für das murine HCMV-Homolog (MCMV) beschrieben wurde (Zimmermann *et al.*, 2005), ergaben sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Hinweise. Frühere Ergebnisse, nach denen ein virusinduzierter Abbau des IRF9-Proteins in der späten Phase der HCMV-Infektion beobachtet wurde (Miller *et al.*, 1999), konnten ebenfalls nicht bestätigt werden. Neben dem bereits oben beschriebenen Einfluss auf die STAT-Phosphorylierung, wurden für RNA-Viren weitere Mechanismen beschrieben, die eine effiziente Signalweitergabe durch den Jak-STAT-Signalweg verhindern. Diese beruhen auf der Interaktion mit inaktiven und/oder aktiven Formen der beiden STAT-Proteine im Zytoplasma. Hierdurch werden die Heterodimerisierung und die nukleäre Translokation von STAT1 und STAT2 verhindert (Gotoh *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2006; Brzozka *et al.*, 2006; Vidy *et al.*, 2007). Da weitere Untersuchungen ergeben haben, dass auch die IFN-induzierte nukleäre Translokation aller drei ISGF3-Komponenten nicht durch IE1 verhindert wird (Abb. 4.6), ist anzunehmen, dass die Blockierung der ISG-Induktion bei HCMV andere Ursachen hat.

5.3.3 Einfluss des IE1-Proteins auf die subnukleäre Verteilung und DNA-Bindung von STAT1, STAT2 und IRF9

Eine intranukleäre Interaktion mit dem ISGF3-Komplex oder einzelner Komponenten, nach Translokation in den Zellkern, wäre ein möglicher Mechanismus, der im Einklang mit der nukleären Lokalisation des IE1-Proteins stünde (Castillo & Kowalik, 2002; Nevels *et al.*, 2004a). Daher wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluss des viralen Proteins auf die subnukleäre Verteilung der einzelnen ISGF3-Komponenten klären sollten. In einem zellulären Fraktionierungsversuch konnte 20 min nach IFN-Behandlung in allen Fraktionen eine IE1-abhängige Akkumulation sowohl von STAT1 als auch von STAT2 beobachtet werden (Abb. 4.8). Diese erhöhten Proteinkonzentrationen waren ein erster Hinweis auf die Wechselwirkung des viralen Proteins mit dem (aktivierten) STAT1-STAT2-Heterodimer.

Ungewöhnlich waren hierbei jedoch die relativ hohen zytoplasmatischen IE1-Mengen des als typisch nukleär bekannten Proteins (Castillo & Kowalik, 2002; Nevels *et al.*, 2004a). Der zytoplasmatische Nachweis des viralen Proteins könnte auf technischen Limitationen bei der subzellulären Fraktionierung beruhen. So könnten, durch das Platzen von Zellkernen, Bestandteile des Nukleoplasmas in die Zytoplasma-Fraktion gelangt sein. Auf der anderen Seite könnte der zytoplasmatische Nachweis von IE1 auch einer bisher nicht beschriebenen, neuen subzellulären Lokalisation des viralen Proteins entsprechen.

Sowohl der Nachweis in der nukleären Matrix als auch in der Chromatin-Fraktion ist konform mit bekannten Eigenschaften von IE1, und zwar mit der Interaktion mit Matrix-assoziierten PML-Körpern und der Assoziation mit zellulärem Chromatin (Lafemina *et al.*, 1989; Kelly *et al.*, 1995; Ahn & Hayward, 1997; Nevels *et al.*, 2004a). Zusätzlich konnten hierbei Beobachtungen über die IE1-vermittelte Auflösung der PML-Körper bestätigt werden (Korioth *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1998). In der nukleären Matrix-Fraktion ist in Anwesenheit von IE1 eine deutliche Abnahme an PML-Formen festzustellen (Abb. 4.12). Stattdessen akkumuliert PML verstärkt im Nukleoplasma, was mit der beschriebenen IE1-vermittelten Umverteilung des zellulären Proteins aus PML-Körpern korreliert (Abb. 4.12; Wilkinson *et al.*, 1998).

Nach IFN-Induktion wäre aufgrund der DNA-Bindung des ISGF3-Komplexes ein Nachweis von STAT1, STAT2 und IRF9 in der Chromatin-Fraktion zu erwarten gewesen. Weil jedoch nach IFN-Behandlung nur STAT2 am Chromatin detektiert werden konnte

(und zwar nur in geringen Mengen und in Anwesenheit von IE1), ist davon auszugehen, dass die Proteinmengen der anderen beiden ISGF3-Komponenten (STAT1 und IRF9) in dieser Fraktion unter der Nachweisgrenze lagen (Abb. 4.8). Das IFN-induzierte IRF9-Protein konnte erst 12 h nach IFN-Behandlung eindeutig nachgewiesen werden. Auffällig war hierbei, dass die IRF9-Proteinmengen in Anwesenheit von IE1, vor allem in der Matrix-Fraktion, deutlich geringer waren als in den IE1-negativen Kontrollansätzen (Abb. 4.8, rechte Seite). Aufgrund dieser Daten kann jedoch noch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob es sich dabei um eine Degradation des IRF9-Proteins handelt, wie sie bereits für den späten Verlauf der HCMV-Infektion beschrieben wurde (Miller *et al.*, 1999). Da es sich bei IRF9 um ein ISG handelt, bietet sich als naheliegende alternative Erklärung die Möglichkeit an, dass durch die IE1-bedingte Blockierung der Jak-STAT-Signalkaskade auch die IRF9 Transkription negativ reguliert wird.

Zum 20 min-Zeitpunkt nach IFN-Behandlung wurde der Hauptanteil der phosphorylierten und heterodimerisierten STAT-Formen erwartungsgemäß in den nukleären Fraktionen gefunden (Abb. 4.8; Mowen & David, 1998). Die Tatsache, dass auch in diesem Fall größere Mengen an pSTAT1 und pSTAT2 in IE1-exprimierenden im Vergleich zu IE1-negativen Zellen akkumulierten, steht im Einklang mit der Vorstellung, dass das virale Protein auch (oder vielleicht sogar bevorzugt?) mit den aktivierten STAT-Formen interagieren kann und möglicherweise deren Dephosphorylierung verhindert. Dies wurde 12 h nach IFN-Behandlung besonders deutlich (Abb. 4.8). Zu diesem Zeitpunkt ist der Jak-STAT-Signalweg aufgrund fehlender Stimulierung wieder abgeschaltet, so dass in den Kontrollzellen die aktivierten STAT-Formen nicht mehr nachzuweisen waren. In IE1-exprimierenden Zellen war der Nachweis von pSTAT1 und pSTAT2 dagegen ohne weiteres möglich (Abb. 4.8, rechte Seite).

Die (De)phosphorylierung der STAT-Proteine ist für die Regulation des Jak-STAT-Signalweges von entscheidender Bedeutung (Ivashkiv & Hu, 2004; Brierley & Fish, 2005b). Die gegenläufigen Prozesse aus Aktivierung und negativer Regulation der STAT-Proteine durch Tyrosinkinasen bzw. -phosphatasen sorgen für eine effiziente Signalweiterleitung und für ein Abschalten nach erfolgter Signaltransduktion (Wormald & Hilton, 2004). Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung ist auch für die Kreisläufe von Bedeutung, die ein kontinuierliches Pendeln von STAT1 und STAT2 zwischen Zellkern und Zytoplasma steuern (Banninger & Reich, 2004; Meyer & Vinkemeier, 2004; Marg *et al.*, 2004; Frahm *et al.*, 2006). Für STAT2 ist in nicht-induziertem Zustand ein relativ langsamer Kernimport bei gleichzeitig schnellem, CRM1-abhängigem nukleären Export

über ein carboxyterminales nukleäres Exportsignal (NES) beschrieben. Der nukleäre Export wird durch Tyrosin-Phosphorylierung unterbunden während die anschließende schnelle Dephosphorylierung von STAT2 (ca. 1 h nach Stimulierung) wiederum den CRM1-vermittelten Export aus dem Zellkern ermöglicht (Banninger & Reich, 2004; Frahm *et al.*, 2006). Möglicherweise kann das IE1-Protein die Dephosphorylierung von pSTAT2 und somit den Export durch CRM1 verhindern, was die Akkumulation im Nukleoplasma 12 h nach IFN-Behandlung zur Folge hat. Durch Retention von aktiviertem STAT2 im Kern würde eine Reaktivierung des Jak-STAT-Signalweges verhindert werden. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bisher nur für das Phosphoprotein P des Rabiesvirus beschrieben. In diesem Fall interagiert das virale Protein mit den phosphorylierten Formen von STAT1 und STAT2 jedoch im Zytoplasma und verhindert dadurch die nukleäre Translokation (Brzozka *et al.*, 2006).

Durch fluoreszenzmikroskopische Kolokalisationsstudien zwischen IE1 und Komponenten des ISGF3-Komplexes konnten weitere Indizien auf eine Interaktion und nukleäre Delokalisation gefunden werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das virale Protein in der Lage ist, STAT1, STAT2 und IRF9 in nukleären, punktförmigen Strukturen der Zelle zu sequestrieren (Abb. 4.13). Die beiden STAT-Proteine kolokalisierten in den meisten Fällen mit IE1 an diesen sphärischen Strukturen, die als PML-Körper identifiziert werden konnten (Abb. 4.11). Für IRF9 konnte ebenfalls, wenn auch nur in weniger als der Hälfte der Zellen, eine Kolokalisation mit dem viralen Protein gefunden werden. Diese Beobachtung steht im scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen der Bindungsstudien, in denen keine Interaktion zwischen IE1 und IRF9 nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.14, 4.15 und 4.17). Möglicherweise waren die Bedingungen für den Nachweis dieser Bindung nicht sensitiv genug. Eine andere Erklärung wäre die zum Teil als konstitutiv beschriebene Assoziation von IRF9 und STAT2 (Martinez-Moczygemba *et al.*, 1997; Lau *et al.*, 2000). IRF9 könnte von IE1 somit indirekt über STAT2 an die PML-Körper sequestriert werden. Eine weitere interessante Beobachtung stellte in diesem Zusammenhang die IE1-vermittelte Sequestrierung von STAT2, als einziger der drei ISGF3-Komponenten, an kondensiertem Chromatin mitotischer Zellen dar (Abb. 4.13, A). Diese Beobachtung spricht dafür, dass innerhalb verschiedener Kerndomänen unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe aus IE1, einer oder mehreren ISGF3-Komponenten und möglicherweise weiteren Proteinen (z. B. PML) existieren könnten.

Die nukleäre Delokalisation des trimeren Komplexes durch IE1 deutet darauf hin, dass das virale Protein den ISGF3-Komplex oder einzelne Komponenten davon an

supramolekularen Strukturen des Zellkerns sequestrieren und somit dessen sequenzspezifische DNA-Bindung verhindern könnte. In der Tat zeigen ChIP-Analysen dieser Arbeit eindeutig, dass IE1 mit der Assoziation zwischen dem ISGF3-Komplex und dem ISRE interferiert. Am Beispiel des ISG54-Promotors konnte für alle drei Komponenten des ISGF3-Komplexes ein effizienter, IE1-vermittelter Block der DNA-Assoziation gezeigt werden (Abb. 4.9, A und B). Experimente in infizierten Zellen bestätigten diese Resultate für STAT2, da das Wildtyp-Virus, im Gegensatz zur IE1-defizienten Mutante, die ISGF3-Assoziation mit dem ISRE deutlich unterdrücken konnte (Abb. 4.9, C).

5.3.4 Physikalische Interaktion des IE1-Proteins mit dem STAT-Heterodimer

Die beobachtete nukleäre Akkumulation der phosphorylierten STAT-Formen, und die inhibierte DNA-Bindung des ISGF3-Komplexes in Anwesenheit von IE1, deuteten bereits auf eine physikalische Interaktion des zellulären Proteinkomplexes mit dem viralen Protein hin. Erste Koimmunpräzipitationen bestätigten diese Vermutung und zeigten nach HCMV-Infektion von primären Fibroblasten eine spezifische Bindung zwischen IE1 und beiden STAT-Proteinen, jedoch keine Bindung an IRF9 (Abb. 4.14).

Diese Bindungsstudien konnten außerhalb des Viruskontextes durch GST-Fällungsreaktionen verifiziert werden. Da in beiden Fällen eine deutlich stärkere Bindung von IE1 an STAT2 im Vergleich zu STAT1 auftrat, wurde vermutet, dass es sich zwischen IE1 und STAT2 um eine direkte Interaktion handelt, wohingegen die STAT1-Bindung möglicherweise nur aufgrund der Heterodimerisierung von STAT1 und STAT2 nachgewiesen wurde (Abb. 4.15). Weitere GST-Fällungsreaktionen bestätigten diese Vermutung. In STAT2-negativen Zellen konnte STAT1 nicht mit dem viralen Protein interagieren. Im Gegensatz dazu fand in STAT1-negativen Zellen eine Bindung zwischen STAT2 und IE1 statt, wenngleich die Interaktion weniger effizient war als in Anwesenheit von STAT1 (Abb. 4.16). Die Bindung zwischen IE1 und STAT2 konnte in STAT1-negativen Zellen jedoch durch zusätzliche IFN-Behandlung stabilisiert werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das virale Protein möglicherweise bevorzugt mit der aktiven, phosphorylierten STAT2-Form interagiert (5.3.3) und eine höhere Affinität zum STAT1-STAT2-Heterodimer haben könnte als zum STAT2-Monomer.

Fehlendes IRF9 hatte dagegen keinen Effekt auf die Interaktion zwischen IE1 und den STAT-Proteinen. Selbst nach Überexpression von IRF9 konnte keine Bindung an IE1 nachgewiesen werden (Abb. 4.17). Möglicherweise verhindert die IE1-Bindung an das STAT-Heterodimer die Assoziation mit IRF9 im Zellkern. Da das IRF9-Protein die DNA-Bindung des ISGF3-Komplexes vermittelt (Bluyssen & Levy, 1997), könnte dies somit zu einem Block der ISG-Induktion führen.

5.4 Strukturanalysen zur Interaktion zwischen IE1 und STAT2

5.4.1 Das HCMV IE1-Protein und relevante Interaktionsdomänen

Die Ergebnisse der Bindungs- und Immunfluoreszenzstudien lassen eine direkte Interaktion zwischen dem HCMV-IE1-Protein und dem STAT2-Protein vermuten. Die Bereiche, die für diese Protein-Protein-Wechselwirkung benötigt werden, wurden bei beiden Bindungspartnern näher eingegrenzt.

Der carboxyterminale Abschnitt des IE1-Proteins spielt bei der Transaktivierung zahlreicher viraler und zellulärer Promotoren durch das virale Protein eine wichtige Rolle (Mocarski *et al.*, 2007). Der Bereich umfasst charakteristische Domänen mit einer Anhäufung an sauren Aminosäuren (Glutamin- und Asparaginsäure) und mehreren Phosphorylierungsstellen (Pajovic *et al.*, 1997; Castillo & Kowalik, 2002; Reinhardt *et al.*, 2005). Daneben findet man in diesem Abschnitt die SUMOylierungsstelle des Proteins und die CTD (*chromatin tethering domain*), welche die Assoziation mit zellulärem Chromatin vermittelt (LaFemina *et al.*, 1989; Spengler *et al.*, 2002). Bei genauerer Betrachtung lässt sich der carboxyterminale Abschnitt des aus 491 Aminosäuren (As) aufgebauten IE1-Proteins in drei saure Domänen (AD1-AD3) und eine Serin/Prolin-reiche Region (S/P, As 395-409) zwischen AD1 (As 373-386) und AD2 (As 421-445) einteilen (Abb. 4.18).

Durch erste Kolokalisationsstudien konnten an Hand von drei GFP-IE1-Mutanten, denen unterschiedlich große Bereiche im carboxyterminalen Abschnitt fehlten, erste Hinweise auf relevante Regionen gewonnen werden, die für eine Wechselwirkung zwischen dem viralen Protein und STAT2 benötigt werden. Die drei „Stopp-Mutanten“, G476Stop, E421Stop und A373Stop, kodieren aufgrund eingebrachter Stopp-Codons für verkürzte IE1-Varianten und haben das Fehlen der CTD-Region (As 476-491) gemeinsam (Abb. 4.18). Diese verkürzten IE1-Varianten konnten somit erwartungsgemäß nicht mehr mit

zellulärem Chromatin assoziieren (Abb. 4.20). Für alle drei Stop-Mutanten konnte jedoch eine Interaktion mit PML-Körpern nachgewiesen werden, da sie die für eine Wechselwirkung mit diesen Strukturen benötigten ersten 346 As enthalten (Ahn *et al.*, 1998). Das Fehlen der Regionen AD1-AD3 und der S/P-Region bei der A373Stop-Mutante verhinderte zwar nicht die Interaktion mit PML-Körpern, die Kolokalisation mit STAT2 blieb jedoch aus (Abb. 4.20, D). Um die Bedeutung der Teilbereiche AD1 bis AD3 und S/P innerhalb des carboxyterminalen Abschnitts für eine Interaktion zwischen IE1 und STAT2 genauer zu untersuchen, wurden einzelne Regionen gezielt deletiert (Abb. 4.19). Bindungsstudien zwischen dem IE1-Protein zusammen mit fünf verschiedenen Deletionsmutanten und STAT2 zeigten für jede einzelne Deletion einen Einfluss auf die Interaktion beider Proteine (Abb. 4.23).

Zusätzlich wurden die Auswirkungen einzelner Punktmutationen im viralen Protein untersucht (Abb. 4.18). Die Punktmutation C279A, innerhalb eines Zink-Finger-ähnlichen Motivs, hatte keinen Einfluss auf die Kolokalisation zwischen IE1 und STAT2. Ebenso wenig konnte der SUMOylierungsstelle (Lysin450) von IE1 eine bedeutende Rolle für die Interaktion mit STAT2 zugeordnet werden. Beide Punktmutanten konnten den zellulären Interaktionspartner sowohl an den PML-Körpern als auch am Chromatin sequestrieren (Abb. 4.21, A und B). Die IE1-Variante L174P dagegen konnte, wie bereits in der Literatur beschrieben, nicht mehr mit PML interagieren (Müller & Dejean, 1999). Erstaunlicherweise wurde durch die Punktmutation jedoch offensichtlich auch die Interaktion mit STAT2 verhindert, da beide Proteine nicht mehr an zellulärem Chromatin kolokalisierten (Abb. 4.21, C). Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass neben den genannten carboxyterminalen Motiven möglicherweise auch Regionen des aminoterminalen Bereiches im IE1-Protein für die Interaktion mit STAT2 benötigt werden. Unbekannt ist dabei allerdings, wie weitreichend sich der nicht-konservative Austausch eines Leucins gegen den „Helixbrecher“ Prolin an Position 174 auf die dreidimensionale Struktur des IE1-Proteins auswirkt. Möglicherweise bewirkt diese Mutation eine globale Konformationsänderung, die sich auch auf den carboxyterminalen Bereiche des viralen Proteins und damit indirekt auf die Interaktion mit STAT2 auswirkt.

Die für die Interaktion mit STAT2 benötigte Region konnte im IE1-Protein aufgrund dieser Ergebnisse und Überlegungen erfolgreich auf eine nur 37 As umfassende Hauptinteraktionsdomäne eingegrenzt werden (Abb. 5.1).

5.4.2 Das zelluläre STAT2-Protein und relevante Interaktionsdomänen

Eine Kartierung des aus 851 As bestehenden STAT2-Proteins durch Verwendung verschiedener STAT2-Varianten gab zusätzlich erste Hinweise auf wichtige Bindungsdomänen des zellulären Interaktionspartners (Abb. 4.24). In Kolokalisationsstudien mit verschiedenen GFP-STAT2-Konstrukten und IE1 konnten die entsprechenden Domänen eingegrenzt werden (Abb. 4.25 und 4.26). Hierbei wurden der aminoterminalen Abschnitt zusammen mit der *coiled-coil* Domäne, zwei zwischen STAT-Proteinen hoch konservierte Regionen, als wichtige Interaktionsdomänen identifiziert (Abb. 4.25, E und 4.26, B). Der aminoterminalen Bereich ist für die Stabilisierung der STAT Dimer-Dimer-Wechselwirkung verantwortlich. Die *coiled-coil* Domäne dagegen ist als allgemeine Interaktionsdomäne, unter anderem auch für IRF9, bekannt (Brierley & Fish, 2005b). Durch eine Interaktion von IE1 mit der *coiled-coil* Domäne könnte das virale Protein möglicherweise die Bindung von IRF9 an STAT2 blockieren, was die zu beobachtende Inhibition der DNA-Bindung des ISGF3-Komplexes erklären würde.

Zusätzlich konnte ein mittlerer Abschnitt des STAT2-Proteins identifiziert werden, der für die Kolokalisation mit IE1 benötigt wird (Abb. 4.25, E). Dieser Bereich schloss auch die SH2-Domäne mit ein. Hierbei handelt es sich um eine ebenfalls STAT-konservierte Domäne, die Phosphotyrosin bindet und somit die Dimerisierung mit anderen STAT-Proteinen vermittelt (Gupta *et al.*, 1996). In diesem mittleren Abschnitt befindet sich zusätzlich eine ebenfalls konservierte DNA-Bindedomäne. Diese ist in STAT2, zumindest für die DNA-Bindung des ISGF3-Komplexes, nicht funktionell und in den schematischen Darstellungen (Abb. 4.24 und 5.1) daher nicht abgebildet. Eine mögliche Beteiligung von STAT2 an der DNA-Bindung anderer STAT-Dimere wird jedoch aktuell diskutiert (Brierley & Fish, 2005a). DNA-Bindedomänen sind für ihren oftmals basischen Charakter bekannt. Eine Interaktion mit der sauren carboxyterminalen IE1-Region wäre daher durchaus denkbar.

Künftige Bindungsstudien, wie sie für den viralen Interaktionspartner durchgeführt wurden, werden zeigen inwiefern die hier beschriebenen Kolokalisationsdaten mit der tatsächlichen physikalischen Interaktion zwischen STAT2 und IE1 korrelieren. In Abbildung 5.1 sind die bisherigen Vorhersagen zu den Bindungsdomänen beider Interaktionspartner dargestellt.

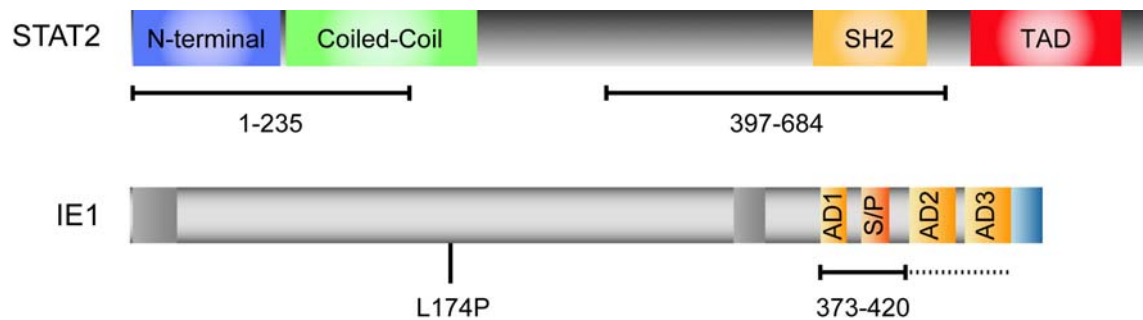


Abb. 5.1: Interaktionsdomänen von IE1 und STAT2. Die schematische Darstellung der beiden Interaktionspartner zeigt die für die Wechselwirkung benötigten Aminosäureabschnitte. N-terminal, Stabilisierung der Dimer-Dimer-Wechselwirkung; *coiled-coil*, allgemeine Protein-Interaktionsdomäne; SH2, Src-Homologie 2 Domäne, vermittelt Dimerisierung über Phosphotyrosin; TAD, Transaktivatordomäne; AD1-AD3, *acidic domain* 1-3; S/P, Serin-/Prolin-reiche Region.

5.5 Modell und Ausblick

Aus der Literatur sind zahlreiche virale Strategien bekannt, die angeborene Immunantwort zu unterdrücken. Dies gilt auch für die Jak-STAT-Signalkaskade, einem der wichtigsten antiviralen Signaltransduktionswege. Im Vergleich zu anderen viralen Proteinen ist der in dieser Arbeit beschriebene Mechanismus für das HCMV IE1-Protein jedoch einzigartig. Das IE1-Protein verhindert nicht die initiale Aktivierung oder die zytoplasmatische Signalweiterleitung innerhalb der Jak-STAT-Signalkaskade sondern interferiert mit einem intranukleären Schritt, der die antivirale Geninduktion unmittelbar kontrolliert. Hierbei scheint die direkte Interaktion mit dem STAT2-Protein von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Wechselwirkung der carboxyterminalen Domäne von IE1 mit dem aminoterminalen Bereich von STAT2 könnte die Bindungsdomäne für IRF9 maskieren und somit die Ausbildung des ISGF3-Komplexes verhindern. Alternativ oder zusätzlich dazu bewirkt IE1 die Delokalisierung des ISGF3-Komplexes oder einzelner Komponenten durch intranukleäre Sequestrierung, z. B. an interchromatinischen PML-Körpern. In der Folge kann der trimere Komplex nicht mehr sequenzspezifisch an ISRE-Sequenzen der ISG-Promotoren binden.

In der schematischen Darstellung der Abb. 5.2 ist neben der Inhibierung der ISG-Induktion eine weitere mögliche Intervention des IE1-Proteins abgebildet. Die Interaktion des HCMV-Proteins mit phosphoryliertem STAT2 könnte die Dephosphorylierung und/oder den Export des zellulären Proteins verhindern. Dieses Eingreifen in den STAT-Kreislauf

würde eine Reduzierung von aktivierbarem STAT im Zytoplasma zur Folge haben und somit eine Reaktivierung des Jak-STAT-Signalweges erschweren. Eine weitere interessante Spekulation bildet die Möglichkeit, dass IE1 das antivirale STAT2-Protein nicht einfach nur inaktivieren sondern durch nukleäre Delokalisation sogar zu Gunsten der HCMV-Replikation, z. B. als Kofaktor für die transkriptionelle Aktivierung viraler Promotoren, nutzen könnte.

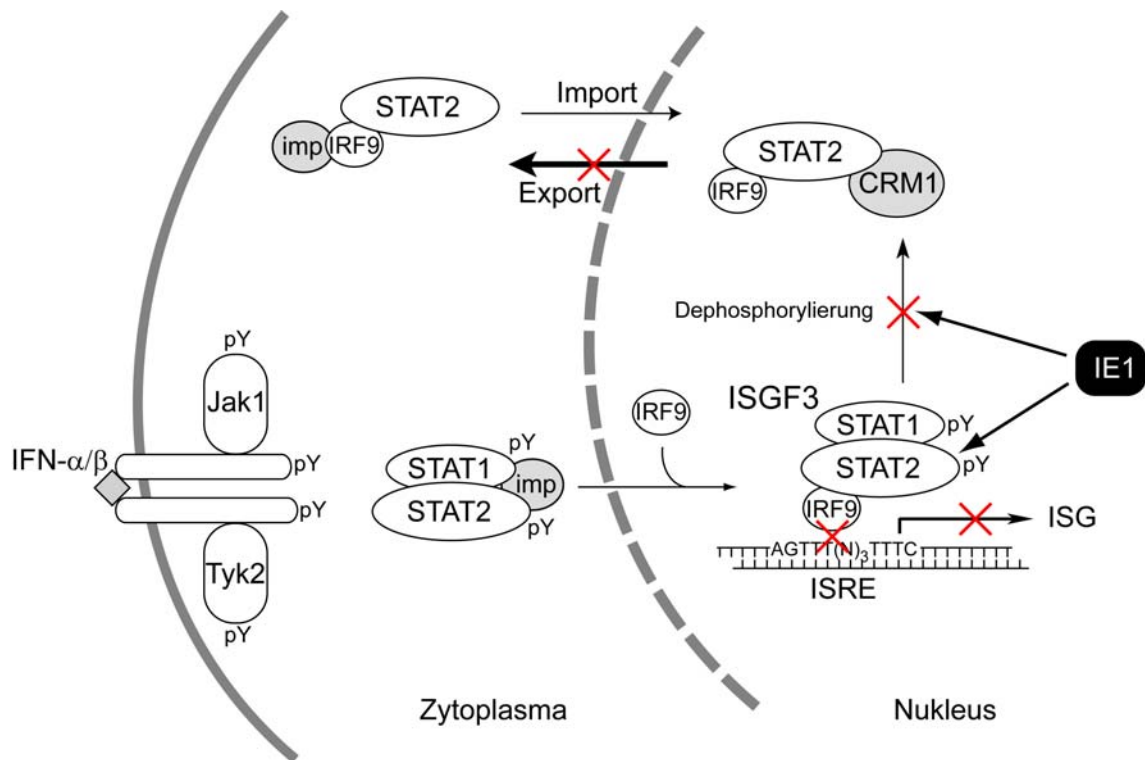


Abb. 5.2: Inhibition der STAT-vermittelten Signaltransduktion der Phase 2 durch das IE1-Protein. Das dargestellte Modell veranschaulicht ein mögliches Eingreifen des IE1-Proteins in verschiedene Prozesse der Signalweitergabe durch STAT2. Zusätzlich abgebildet ist der über Importin und CRM1-vermittelte STAT2-Kreislauf von konstitutiv mit IRF9 assoziiertem STAT2. CRM1, *chromosome region maintenance 1*; imp, Importin; pY, phosphorylierter Tyrosinrest.

Zusammenfassend konnte für das HCMV IE1-Protein in dieser Arbeit erstmals eine bisher einzigartige Modulierung einer der wichtigsten antiviralen Signaltransduktionskaskaden beschrieben werden. Weitere Studien dieser Virus-Wirtsinteraktion werden künftig zusätzliche Informationen über die virale Interferenz mit der komplexen Jak-STAT-Signalkaskade liefern. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten langfristig einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer antiviraler Strategien leisten, die das IE1-Protein und/oder die zellulären IFN-vermittelten Signalwege betreffen.

6 Literaturverzeichnis

- Aaronson, D. S. & Horvath, C. M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653-5.
- Abate, D. A., Watanabe, S. & Mocarski, E. S. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* **78**, 10995-1006.
- Aebi, M., Fah, J., Hurt, N., Samuel, C. E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O. & Staeheli, P. (1989). cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol* **9**, 5062-72.
- Ahn, J. H., Brignole, E. J., 3rd & Hayward, G. S. (1998). Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol* **18**, 4899-913.
- Ahn, J. H. & Hayward, G. S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* **71**, 4599-613.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. & Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Au, W. C., Moore, P. A., LaFleur, D. W., Tombal, B. & Pitha, P. M. (1998). Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *J Biol Chem* **273**, 29210-7.
- Au, W. C., Moore, P. A., Lowther, W., Juang, Y. T. & Pitha, P. M. (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11657-61.
- Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Chee, M. S., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E. & et al. (1991). The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq* **2**, 1-12.
- Banninger, G. & Reich, N. C. (2004). STAT2 nuclear trafficking. *J Biol Chem* **279**, 39199-206.
- Basta, S. & Bennink, J. R. (2003). A survival game of hide and seek: cytomegaloviruses and MHC class I antigen presentation pathways. *Viral Immunol* **16**, 231-42.
- Bergbauer, M. (2006). Molekulare Untersuchungen zur Histon-Modifikation in Zytomegalievirus-infizierten humanen Fibroblasten. Diplomarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, Regensburg.
- Bernardi, R. & Pandolfi, P. P. (2003). Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* **22**, 9048-57.
- Biron, C. A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators-a new look. *Immunity* **14**, 661-4.
- Biron, K. K. (2006). Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* **71**, 154-63.
- Bluyssen, H. A. & Levy, D. E. (1997). Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *J Biol Chem* **272**, 4600-5.

- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**, 749-95.
- Boehme, K. W., Singh, J., Perry, S. T. & Compton, T. (2004). Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol* **78**, 1202-11.
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W. & Radsak, K. (1996). Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol* **77**, 2297-302.
- Boyle, K. A. & Compton, T. (1998). Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol* **72**, 1826-33.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brierley, M. M. & Fish, E. N. (2005a). Functional relevance of the conserved DNA-binding domain of STAT2. *J Biol Chem* **280**, 13029-36.
- Brierley, M. M. & Fish, E. N. (2005b). Stats: multifaceted regulators of transcription. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 733-44.
- Britt, W. (2006). Maturation and egress. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge: *Cambridge Press*, 308-20.
- Britt, W. J. & Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* **39**, 401-12.
- Browne, E. P. & Shenk, T. (2003). Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11439-44.
- Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D. & Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* **75**, 12319-30.
- Brzozka, K., Finke, S. & Conzelmann, K. K. (2006). Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J Virol* **80**, 2675-83.
- Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B. & Dargan, D. J. (1998). Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J Struct Biol* **124**, 70-6.
- Castillo, J. P. & Kowalik, T. F. (2002). Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* **290**, 19-34.
- Chang, H. M., Paulson, M., Holko, M., Rice, C. M., Williams, B. R., Marie, I. & Levy, D. E. (2004). Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9578-83.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A. & et al. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-69.
- Chen, D. H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F. & Zhou, Z. H. (1999). Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**, 10-6.
- Child, S. J., Hakki, M., De Niro, K. L. & Geballe, A. P. (2004). Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol* **78**, 197-205.
- Cinatl, J., Jr., Cinatl, J., Vogel, J. U., Rabenau, H., Kornhuber, B. & Doerr, H. W. (1996). Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology* **39**, 259-69.

- Cinatl, J., Scholz, M., Kotchetkov, R., Vogel, J. U. & Doerr, H. W. (2004a). Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends Mol Med* **10**, 19-23.
- Cinatl, J., Jr., Vogel, J. U., Kotchetkov, R. & Wilhelm Doerr, H. (2004b). Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 59-77.
- Clemens, M. J. (2003). Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* **23**, 277-92.
- Cobbs, C. S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G. Y., Bharara, S., King, P. H., Nabors, L. B., Cobbs, C. G. & Britt, W. J. (2002). Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* **62**, 3347-50.
- Cohen, J. I. & Corey, G. R. (1985). Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* **64**, 100-14.
- Colamonici, O., Yan, H., Domanski, P., Handa, R., Smalley, D., Mullersman, J., Witte, M., Krishnan, K. & Krolewski, J. (1994). Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **14**, 8133-42.
- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-41.
- Damato, E. G. & Winnen, C. W. (2002). Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **31**, 86-92.
- Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-5.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-21.
- Dastoor, Z. & Dreyer, J. L. (2001). Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci* **114**, 1643-53.
- DeFilippis, V. R. (2007). Induction and evasion of the type I interferon response by cytomegaloviruses. *Adv Exp Med Biol* **598**, 309-24.
- DeFilippis, V. R., Robinson, B., Keck, T. M., Hansen, S. G., Nelson, J. A. & Fruh, K. J. (2006). Interferon regulatory factor 3 is necessary for induction of antiviral genes during human cytomegalovirus infection. *J Virol* **80**, 1032-7.
- Dellaire, G. & Bazett-Jones, D. P. (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* **26**, 963-77.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-8.
- Diaz, M. O., Pomykala, H. M., Bohlander, S. K., Maltepe, E., Malik, K., Brownstein, B. & Olopade, O. I. (1994). Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* **22**, 540-52.
- Dulbecco, R. & Vogt, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* **99**, 167-82.
- Enquist, L. W. & Card, J. (1996). Pseudorabies virus: a tool for tracing neuronal connections, p. 333-48. In P. R. Lowenstein (ed.), *protocols for gene transfer in neuroscience: towards gene therapy of neurological disorders*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Everett, R. D. & Chelbi-Alix, M. K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* **89**, 819-30.

- Fey, E. G., Wan, K. M. & Penman, S. (1984). Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol* **98**, 1973-84.
- Fimia, G. M., Evangelisti, C., Alonzi, T., Romani, M., Fratini, F., Paonessa, G., Ippolito, G., Tripodi, M. & Piacentini, M. (2004). Conventional protein kinase C inhibition prevents alpha interferon-mediated hepatitis C virus replicon clearance by impairing STAT activation. *J Virol* **78**, 12809-16.
- Frahm, T., Hauser, H. & Koster, M. (2006). IFN-type-I-mediated signaling is regulated by modulation of STAT2 nuclear export. *J Cell Sci* **119**, 1092-104.
- Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. & Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1032-60.
- Gawn, J. M. & Greaves, R. F. (2002). Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. *J Virol* **76**, 4441-55.
- Gibson, W. (2006). Assembly and maturation of the capsid. In: Reddehase, M. J., Editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control*. Norfolk, United Kingdom: Caister Scientific Press, 231-44.
- Goodbourn, S., Didcock, L. & Randall, R. E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**, 2341-64.
- Gotoh, B., Komatsu, T., Takeuchi, K. & Yokoo, J. (2002). Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. *Rev Med Virol* **12**, 337-57.
- Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-67.
- Grandvaux, N., Servant, M. J., tenOever, B., Sen, G. C., Balachandran, S., Barber, G. N., Lin, R. & Hiscott, J. (2002). Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **76**, 5532-9.
- Greaves, R. F. & Mocarski, E. S. (1998). Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* **72**, 366-79.
- Grundy, J. E., McKeating, J. A., Ward, P. J., Sanderson, A. R. & Griffiths, P. D. (1987). Beta 2 microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor. *J Gen Virol* **68**, 793-803.
- Guan, K. L. & Dixon, J. E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* **192**, 262-7.
- Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J. & Schindler, C. (1996). The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. *Embo J* **15**, 1075-84.
- Hakki, M. & Geballe, A. P. (2005). Double-stranded RNA binding by human cytomegalovirus pTRS1. *J Virol* **79**, 7311-8.
- Hakki, M., Marshall, E. E., De Niro, K. L. & Geballe, A. P. (2006). Binding and nuclear relocalization of protein kinase R by human cytomegalovirus TRS1. *J Virol* **80**, 11817-26.
- Haller, O. & Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**, 710-7.

- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. (2007). Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 425-33.
- Harris, S., Ahlfors, K., Ivarsson, S., Lernmark, B. & Svanberg, L. (1984). Congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. *Ear Hear* **5**, 352-5.
- Hauer, E.-M. (2007). Dissertation, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, Regensburg. In Vorbereitung.
- Hayward, G. S., Jacob, R. J., Wadsworth, S. C. & Roizman, B. (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4243-7.
- Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, A., Fujisawa, J. I., Haynes, J. R., Hochstadt, J., Kovacic, T., Pasek, M., Schambeck, A., Schmid, J. & et al. (1985). Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes. *J Mol Biol* **185**, 227-60.
- Hengel, H., Koszinowski, U. H. & Conzelmann, K. K. (2005). Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol* **26**, 396-401.
- Hierholzer, J. C. & Killington, R. A. (1996). Virus isolation and quantitation. In: Mahy, B. W. J., Kangro, H. O. (Eds.), *Virology Methods Manual*. Academic Press, San Diego, 25-47.
- Hiscott, J., Pitha, P., Genin, P., Nguyen, H., Heylbroeck, C., Mamane, Y., Algarte, M. & Lin, R. (1999). Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 1-13.
- Ho, M. (1991). *Cytomegalovirus: Biology and Infection*, 2nd ed. New York: Plenum.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-9.
- Ihle, J. N. (1995). The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol* **60**, 1-35.
- Ihle, J. N. & Kerr, I. M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* **11**, 69-74.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-67.
- Isaacson, M. K., Feire, A. L. & Compton, T. (2007). Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol* **81**, 6241-7.
- Ivashkiv, L. B. & Hu, X. (2004). Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther* **6**, 159-68.
- Jacobs, J. P. (1966). A simple medium for the propagation and maintenance of human diploid cell strains. *Nature* **210**, 100-1.
- John, J., McKendry, R., Pellegrini, S., Flavell, D., Kerr, I. M. & Stark, G. R. (1991). Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons. *Mol Cell Biol* **11**, 4189-95.
- Kaerber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **162**, 480-7.
- Kaps, J. (2006). Molekulare Untersuchungen zur Rolle des *immediate early 1*-Proteins bei der Interferonresistenz humaner Zytomegalieviren. Diplomarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, Regensburg.
- Kelly, C., Van Driel, R. & Wilkinson, G. W. (1995). Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **76**, 2887-93.

- Knoblach, T. (2006). Herstellung und molekulare Charakterisierung von humanen Zytomegalieviren mit spezifischen Mutationen im Immediate Early 1-Gen. Diplomarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, Regensburg.
- Korioth, F., Maul, G. G., Plachter, B., Stamminger, T. & Frey, J. (1996). The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res* **229**, 155-8.
- Krishnan, K., Singh, B. & Krolewski, J. J. (1998). Identification of amino acid residues critical for the Src-homology 2 domain-dependent docking of Stat2 to the interferon alpha receptor. *J Biol Chem* **273**, 19495-501.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M. & Hartmann, G. (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 2154-63.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafemina, R. L., Pizzorno, M. C., Mosca, J. D. & Hayward, G. S. (1989). Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* **172**, 584-600.
- LaFleur, D. W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, P., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roshke, V., Chen, G., Ruben, S. M., Pitha, P. M., Coleman, T. A. & Moore, P. A. (2001). Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem* **276**, 39765-71.
- Larner, A. C., Jonak, G., Cheng, Y. S., Korant, B., Knight, E. & Darnell, J. E., Jr. (1984). Transcriptional induction of two genes in human cells by beta interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6733-7.
- Lau, J. F., Parisien, J. P. & Horvath, C. M. (2000). Interferon regulatory factor subcellular localization is determined by a bipartite nuclear localization signal in the DNA-binding domain and interaction with cytoplasmic retention factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7278-83.
- Le Roy, E., Muhlethaler-Mottet, A., Davrinche, C., Mach, B. & Davignon, J. L. (1999). Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4 (+) T-cell response is mediated by repression of gamma interferon-induced class II transactivator expression. *J Virol* **73**, 6582-9.
- Leung, S., Qureshi, S. A., Kerr, I. M., Darnell, J. E., Jr. & Stark, G. R. (1995). Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Mol Cell Biol* **15**, 1312-7.
- Levy, D., Larner, A., Chaudhuri, A., Babiss, L. E. & Darnell, J. E., Jr. (1986). Interferon-stimulated transcription: isolation of an inducible gene and identification of its regulatory region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8929-33.
- Limaye, A. P., Corey, L., Koelle, D. M., Davis, C. L. & Boeckh, M. (2000). Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* **356**, 645-9.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M. & Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**, 2986-96.
- Lin, W., Kim, S. S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Kim, K. A., Holtzman, M. J. & Chung, R. T. (2006). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* **80**, 9226-35.
- Lopper, M. & Compton, T. (2004). Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J Virol* **78**, 8333-41.
- Malm, G. & Engman, M. L. (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med* **12**, 154-9.

- Malmgaard, L. (2004). Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* **24**, 439-54.
- Marchini, A., Liu, H. & Zhu, H. (2001). Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol* **75**, 1870-8.
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M. & Vinkemeier, U. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* **165**, 823-33.
- Marie, I., Durbin, J. E. & Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo J* **17**, 6660-9.
- Martinez-Moczygemba, M., Gutch, M. J., French, D. L. & Reich, N. C. (1997). Distinct STAT structure promotes interaction of STAT2 with the p48 subunit of the interferon-alpha-stimulated transcription factor ISGF3. *J Biol Chem* **272**, 20070-6.
- Maul, G. G., Yu, E., Ishov, A. M. & Epstein, A. L. (1995). Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem* **59**, 498-513.
- McKendry, R., John, J., Flavell, D., Muller, M., Kerr, I. M. & Stark, G. R. (1991). High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both alpha and gamma interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11455-9.
- McVoy, M. A. & Adler, S. P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* **68**, 1040-51.
- Meager, A. (2002). Biological assays for interferons. *J Immunol Methods* **261**, 21-36.
- Meinel, S. (2006). Molekulare Charakterisierung funktioneller Bereiche im IE72-Protein des humanen Zytomegalievirus. Praxissemesterarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, Regensburg. Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik, Hochschule Anhalt (FH).
- Melen, K., Kinnunen, L. & Julkunen, I. (2001). Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* **276**, 16447-55.
- Melnick, J. L., Adam, E. & Debakey, M. E. (1993). Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur Heart J* **14** Suppl K, 30-8.
- Melnick, J. L., Hu, C., Burek, J., Adam, E. & DeBakey, M. E. (1994). Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J Med Virol* **42**, 170-4.
- Meyer, T. & Vinkemeier, U. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem* **271**, 4606-12.
- Miller, D. M., Rahill, B. M., Boss, J. M., Lairmore, M. D., Durbin, J. E., Waldman, J. W. & Sedmak, D. D. (1998). Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* **187**, 675-83.
- Miller, D. M., Zhang, Y., Rahill, B. M., Waldman, W. J. & Sedmak, D. D. (1999). Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J Immunol* **162**, 6107-13.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., Minna, J. D. & et al. (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**, 171-80.
- Mocarski, E. S., Shenk T. & Pass, R. F. (2007) Cytomegaloviruses. In: Knipe, D. M., Howley, P. M, Editors. *Fields Virology*, 5th Edition, Volume Two. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2701-72.

- Mocarski, E. S., Kemble, G. W., Lyle, J. M. & Greaves, R. F. (1996). A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11321-6.
- Mocarski, E. S. Cytomegalovirus biology and replication. (1993). In: Roizman B, Whitley R, Lopez C, eds. The Human Herpesviruses. New York: *Raven Press*, 173-226.
- Mocarski, E. S., Liu, A. C. & Spaete, R. R. (1987). Structure and variability of the a sequence in the genome of human cytomegalovirus (Towne strain). *J Gen Virol* **68**, 2223-30.
- Mogensen, K. E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. & Uze, G. (1999). The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 1069-98.
- Muller, S. & Dejean, A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* **73**, 5137-43.
- Murphy, E., Rigoutsos, I., Shibuya, T. & Shenk, T. E. (2003a). Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13585-90.
- Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A., Hahn, G., Nelson, J. A., Myers, R. M. & Shenk, T. E. (2003b). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14976-81.
- Nakaya, T., Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Suemori, H., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2001). Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 1150-6.
- Navarro, L., Mowen, K., Rodems, S., Weaver, B., Reich, N., Spector, D. & David, M. (1998). Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol Cell Biol* **18**, 3796-802.
- Nevels, M., Brune, W. & Shenk, T. (2004a). SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *J Virol* **78**, 7803-12.
- Nevels, M., Paulus, C. & Shenk, T. (2004b). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17234-9.
- Nicholl, M. J., Robinson, L. H. & Preston, C. M. (2000). Activation of cellular interferon-responsive genes after infection of human cells with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **81**, 2215-8.
- Novick, D., Cohen, B. & Rubinstein, M. (1994). The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**, 391-400.
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S. & Sata, T. (2003). Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* **77**, 8541-7.
- Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U. & Helenius, A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**, 4922-31.
- Pajovic, S., Wong, E. L., Black, A. R. & Azizkhan, J. C. (1997). Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 6459-64.
- Pass, R. F. (2001). Cytomegalovirus. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., *et al.*, Editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2675-2705.
- Pellegrini, S., John, J., Shearer, M., Kerr, I. M. & Stark, G. R. (1989). Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol Cell Biol* **9**, 4605-12.

- Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* **202**, 8-32.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**(9), e45. 2002-7.
- Plotkin, S. A., Furukawa, T., Zygraich, N. & Huygelen, C. (1975). Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun* **12**, 521-7.
- Poma, E. E., Kowalik, T. F., Zhu, L., Sinclair, J. H. & Huang, E. S. (1996). The human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with the cellular p107 protein and relieves p107-mediated transcriptional repression of an E2F-responsive promoter. *J Virol* **70**, 7867-77.
- Preston, C. M., Harman, A. N. & Nicholl, M. J. (2001). Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J Virol* **75**, 8909-16.
- Radsak, K., Schneider, D., Jost, E. & Brucher, K. H. (1989). Alteration of nuclear lamina protein in human fibroblasts infected with cytomegalovirus (HCMV). *Arch Virol* **105**, 103-12.
- Reddehase, M. J. (2000). The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr Opin Immunol* **12**, 390-6.
- Regad, T. & Chelbi-Alix, M. K. (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* **20**, 7274-86.
- Reinhardt, J., Smith, G. B., Himmelheber, C. T., Azizkhan-Clifford, J. & Mocarski, E. S. (2005). The carboxyl-terminal region of human cytomegalovirus IE1491aa contains an acidic domain that plays a regulatory role and a chromatin-tethering domain that is dispensable during viral replication. *J Virol* **79**, 225-33.
- Roberts, R. M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D. & Bixby, J. (1998). The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 805-16.
- Rodriguez, J. J., Parisien, J. P. & Horvath, C. M. (2002). Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol* **76**, 11476-83.
- Roizman, B. (1979). The organization of the herpes simplex virus genomes. *Annu Rev Genet* **13**, 25-57.
- Roizman, B. & Baines, J. (1991). The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **14**, 63-79.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (1998a). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* **441**, 106-10.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-48.
- Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E. & Taniguchi, T. (1998b). Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett* **425**, 112-6.

- Scalzo, A. A., Corbett, A. J., Rawlinson, W. D., Scott, G. M. & Degli-Esposti, M. A. (2007). The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol* **85**, 46-54.
- Schafer, S. L., Lin, R., Moore, P. A., Hiscott, J. & Pitha, P. M. (1998). Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* **273**, 2714-20.
- Schindler, C. (1999). Cytokines and JAK-STAT signaling. *Exp Cell Res* **253**, 7-14.
- Schindler, C. & Darnell, J. E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* **64**, 621-51.
- Sehgal, P. B. (1982). The interferon genes. *Biochim Biophys Acta* **695**, 17-33.
- Sen, G. C. (2001). Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**, 255-81.
- Sen, G. C. & Lengyel, P. (1992). The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem* **267**, 5017-20.
- Servant, M. J., Grandvaux, N. & Hiscott, J. (2002). Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3. *Biochem Pharmacol* **64**, 985-92.
- Shen, Y., Zhu, H. & Shen, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3341-5.
- Silva, M. C., Yu, Q. C., Enquist, L. & Shen, T. (2003). Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J Virol* **77**, 10594-605.
- Silverman, R. H. (1994). Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. *J Interferon Res* **14**, 101-4.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W. & Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**, 1007-21.
- Spaete, R. R., Gehrz, R. C. & Landini, M. P. (1994). Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* **75**, 3287-308.
- Spengler, M. L., Kurapatwinski, K., Black, A. R. & Azizkhan-Clifford, J. (2002). SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *J Virol* **76**, 2990-6.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. & Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-64.
- Stinski, M. F., Meier J. (2006). Immediate early viral gene regulation and function. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge Press, 239-61.
- Stinski, M. F., Thomsen, D. R., Stenberg, R. M. & Goldstein, L. C. (1983). Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Virol* **46**, 1-14.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L. & van Driel, R. (1992). A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci* **101**, 773-84.
- Suhara, W., Yoneyama, M., Kitabayashi, I. & Fujita, T. (2002). Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* **277**, 22304-13.
- Takaoka, A. & Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* **8**, 907-22.
- Takeda, K. & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14.

- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S. & Stamminger, T. (2007). The ND10 components PML and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J Virol*. Im Druck.
- Taylor, R. T. & Bresnahan, W. A. (2005). Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. *J Virol* **79**, 3873-7.
- Taylor, R. T. & Bresnahan, W. A. (2006). Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *J Virol* **80**, 920-8.
- Terenzi, F., Hui, D. J., Merrick, W. C. & Sen, G. C. (2006). Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *J Biol Chem* **281**, 34064-71.
- Terhune, S. S., Schroer, J. & Shenk, T. (2004). RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol* **78**, 10390-8.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* **60**, 163-78.
- Vancikova, Z. & Dvorak, P. (2001). Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals--a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **1**, 179-87.
- Vidy, A., El Bougrini, J., Chelbi-Alix, M. K. & Blondel, D. (2007). The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1. *J Virol* **81**, 4255-63.
- Villarejo, M. R. & Zabin, I. (1974). Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* **120**, 466-74.
- Wang, X., Huang, D. Y., Huong, S. M. & Huang, E. S. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med* **11**, 515-21.
- Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N. & Huang, E. S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**, 456-61.
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M. & Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* **1**, 507-18.
- Weber, F., Kochs, G. & Haller, O. (2004). Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* **17**, 498-515.
- Weller, T. H., Hanshaw, J. B. & Scott, D. E. (1960). Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**, 130-2.
- Wilkinson, G. W., Kelly, C., Sinclair, J. H. & Rickards, C. (1998). Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J Gen Virol* **79**, 1233-45.
- Wormald, S. & Hilton, D. J. (2004). Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* **279**, 821-4.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E. & Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J* **17**, 1087-95.
- Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T. & Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14470-5.

- Zhu, H., Cong, J. P. & Shenk, T. (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13985-90.
- Zhu, H., Shen, Y. & Shenk, T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* **69**, 7960-70.
- Zimmermann, A. & Hengel, H. (2006). Cytomegalovirus interference with interferons. In: Reddehase, M.J., Editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control*. Norfolk, United Kingdom: Caister Scientific Press, 321-40.
- Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U. & Hengel, H. (2005). A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN-gamma signaling and antiviral responses. *J Exp Med* **201**, 1543-53.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines HCMV-Partikels.....	4
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der HCMV-Genomorganisation.....	5
Abb. 2.3: Infektionszyklus des HCMV.	7
Abb. 2.4: Die <i>major</i> IE-Region.....	9
Abb. 2.5: Angeborene antivirale IFN-Antwort der Zelle.	13
Abb. 3.1: Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenese durch Fusions-PCR.	29
Abb. 4.1: Effekte von exogenem IFN- α bzw. Neutralisation von endogenem IFN- β auf die Ausbeute an Wildtyp (Towne)- und IE1-defizienten (CR208) Nachkommenviren.	41
Abb. 4.2: Die Expression von IE1 interferiert mit der Induktion von ISG.....	42
Abb. 4.3: Blockierung der <i>de novo</i> Protein-Synthese verursacht vergleichbare ISG54-Induktion bei Infektion mit Towne bzw. CR208.	43
Abb. 4.4: IE1 kann unabhängig von anderen viralen Faktoren der Induktion von ISG entgegenwirken.	44
Abb. 4.5: Effekt von IE1 auf die Gleichgewichtsmengen und die IFN-induzierte Phosphorylierung der Komponenten des ISGF3-Komplexes.....	46
Abb. 4.6: Einfluss von IE1 auf die Lokalisation der Komponenten des ISGF3.....	47
Abb. 4.7: Gesamtproteinmengen der subzellulären Fraktionen.....	48
Abb. 4.8: Subzelluläre Verteilung der Komponenten des ISGF3 in Ab- und Anwesenheit von IE1.	49
Abb. 4.9: IE1 inhibiert die DNA-Assoziation der Komponenten des ISGF3.....	52
Abb. 4.10: Subzelluläre Verteilung von STAT2.	53
Abb. 4.11: Kolokalisation von IE1 und PML bzw. STAT2 und PML.	54
Abb. 4.12: Subzelluläre Verteilung von PML in Abhängigkeit von IE1.	54
Abb. 4.13: Nukleäre Lokalisation von IE1 und Komponenten des ISGF3.	55
Abb. 4.14: Physikalische Interaktion zwischen IE1 und Proteinen des ISGF3-Komplexes <i>in vivo</i>	57

Abb. 4.15: Physikalische Interaktion zwischen IE1 und Proteinen des ISGF3-Komplexes <i>in vitro</i> ..	58
Abb. 4.16: Wechselseitige Abhängigkeit der IE1-STAT1- und IE1-STAT2-Interaktion von den jeweils anderen ISGF3-Komponenten.....	59
Abb. 4.17: Überexpression von IRF9.....	60
Abb. 4.18: Schematische Übersicht des HCMV IE1-Proteins und wichtiger regulatorischer Domänen.....	61
Abb. 4.19: Darstellung der neu hergestellten Deletionsmutanten von HCMV IE1.....	62
Abb. 4.20: Kolokalisationsstudien zwischen STAT2 und IE1-Stopp-Mutanten.....	64
Abb. 4.21: Kolokalisationsstudien zwischen STAT2 und IE1-Punktmutanten.....	65
Abb. 4.22: Kolokalisationsstudien zwischen STAT2 und internen IE1-Deletionsmutanten.	67
Abb. 4.23: Physikalische Interaktion zwischen verschiedenen IE1-Konstrukten und STAT2.....	69
Abb. 4.24: Das STAT2-Protein und verwendete STAT2-Mutanten.	71
Abb. 4.25: Kolokalisationsstudien zwischen IE1 und carboxyterminalen STAT2-Mutanten.	72
Abb. 4.26: Kolokalisationsstudien zwischen IE1 und aminoterminalen STAT2-Mutanten.	73
Abb. 5.1: Interaktionsdomänen von IE1 und STAT2.....	86
Abb. 5.2: Inhibierung der STAT-vermittelten Signaltransduktion der Phase 2 durch das IE1-Protein.	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Verwendete Primärantikörper gegen zelluläre Proteine.....	18
Tab. 3.2 : Verwendete Primärantikörper gegen virale Proteine.	18
Tab. 3.3: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen.....	19
Tab. 3.4: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Analysen.....	20
Tab. 3.5: Verwendete Oligonukleotide.....	21
Tab. 3.6: Verwendete Plasmide.....	23
Tab. 3.7: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	24
Tab. 3.8: Verwendete humane Zelllinien.	25
Tab. 3.9: Verwendete Virusstämme.....	25

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AD1	Saure Domäne 1 (<i>acidic domain 1</i>)
AD2	Saure Domäne 2 (<i>acidic domain 2</i>)
AD3	Saure Domäne 3 (<i>acidic domain 3</i>)
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cm	Zentimeter
ca.	circa
Ch	Chromatin
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
CSK	<i>cytoskeleton</i>
CTD	Chromatin Bindedomäne (<i>chromatin tethering domain</i>)
Da	Dalton
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>dots per inch</i>
E	früh (<i>early</i>)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>et al.</i>	und andere
evtl.	eventuell
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde (<i>hour</i>)
HA	Influenzavirus Hämagglutinin-Epitop
HCMV	Humanes Zytomegalievirus (<i>human cytomegalovirus</i>)
HRP	Merretichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IE	sehr früh (<i>immediate early</i>)
IE1	HCMV 72kDa-IE1-Protein
IE2	HCMV 86kDa-IE2-Protein
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IFNAR1	Interferon- α/β -Rezeptor, Untereinheit 1
IFNAR2	Interferon- α/β -Rezeptor, Untereinheit 2
Ig	Immunglobulin
imp	Importin
incl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
ISG	<i>interferon-stimulated gene</i>
ISGF3	<i>interferon-stimulated gene factor 3</i>
Jak	Janus-Kinase
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton

KoIP	Koimmunpräzipitation
l	Liter
L	spät (<i>late</i>)
LB	Luria-Bertani
m	Meter
M	molar (mol/l)
max.	maximal
MCMV	murines Zytomegalievirus (<i>murine cytomegalovirus</i>)
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NM	nukleäre Matrix
NP	Nukleoplasma
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFU	Plaque-bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PML	Promyelozytische Leukämie (<i>promyelocytic leukemia</i>)
polyA	Polyadenylierungsstelle
Pos.	Position
pp	phospho-Protein
pY	phosphoryliertes Tyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH2	Src-Homologie 2 Domäne (<i>src homology 2 domain</i>)
S/P	Serin-/Prolin-reiche Region
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT2	<i>signal transducer and activator of transcription 2</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
T _m	Schmelztemperatur der DNA
TLR	<i>toll like receptor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyk	Tyrosin-Kinase
U	enzymatische Aktivität in µmol/min (<i>units</i>)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett(strahlung), 10-400nm Wellenlänge
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel
ZP	Zytoplasma

Symbole:

%	Prozent	&	und
°C	Grad Celsius	~	etwa

Präfixe für Einheiten:

Präfix	Symbol	Faktor	Präfix	Symbol	Faktor
Kilo	k	10^3	Centi	c	10^{-2}
Hekto	h	10^2	Milli	m	10^{-3}
Deka	da	10^1	Mikro	μ	10^{-6}
Dezi	d	10^{-1}	Nano	n	10^{-9}

Kurschreibweisen der Aminosäuren:

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

9 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Krauss S., Paulus C., Nevels M. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein antagonizes the interferon-mediated antiviral host cell response. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover, 2005.

Paulus C., **Krauss S.**, Schröer J., Nevels M. Human cytomegalovirus IE1 protein targets STAT2 to antagonize the interferon-mediated antiviral host cell response. International Herpesvirus Workshop, Turku/Finnland, 2005.

Krauss S., Paulus C., Hauer E.-M., Nevels M. The interaction between the human cytomegalovirus immediate-early 1 protein and STAT2 reveals a novel nuclear mechanism of blocking interferon signaling. Third European Congress of Virology, Nürnberg, 2007.

Vorträge bei Fachtagungen

Paulus C., **Krauss S.**, Nevels M. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein activates viral and blocks activation of antiviral gene expression via a novel chromatin-based mechanism. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover, 2005.

Paulus C., **Krauss S.**, Shenk T., Nevels M. The human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by blocking an intranuclear step in antiviral interferon signaling. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, 2006.

Artikel in Fachzeitschriften

Paulus C.*, **Krauss S.***, Nevels M. (2006) A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (10), 3840-3845.

* = contributed equally

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Hans Wolf** für die Möglichkeit diese Dissertation an einem hervorragend ausgestatteten Institut durchführen zu können und für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Michael Thomm danke ich vielmals dafür, dass er sich bereit erklärt hat das Erstgutachten für diese Arbeit zu übernehmen, wodurch diese „externe“ Dissertation erst möglich wurde.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei **Frau Dr. Christina Paulus** und **Herrn Dr. Michael Nevels**. Die Anleitung und das große Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen, die selbstverständliche Bereitschaft ihr Wissen mit mir jederzeit zu teilen und die kritische Durchsicht des Manuskripts waren eine große Hilfe und Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke allen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** für das hervorragende Arbeitsklima und ihre ständige Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich **Eva-Maria Hauer** und **Sandra Meinel** für die Bereitstellung der Plasmid-Konstrukte danken. Außerdem bedanke ich mich bei **Dr. Jörg Schröer** und **Timo Sieber** für die wissenschaftlichen Anregungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Nicht zuletzt danke ich meiner Laborkollegin **Ines Tschertner** für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die große Unterstützung im Laboralltag.

Ich bedanke mich bei allen **Mitgliedern des Instituts** für die freundliche Aufnahme und die wertvolle und hilfreiche Unterstützung.

Von ganzem Herzen danke ich **meiner Familie, Freunden** und besonders **Katrin**. Insbesondere **meinen Eltern** danke ich für ihr großes Interesse und ihre Unterstützung das ganze Studium hindurch, wodurch diese Dissertation erst möglich wurde.